

PhD ÉRTEKEZÉS

---

FEHÉRJEDINAMIKA VIZSGÁLATA A LUMINESZCENCIA  
SPEKTROSKÓPIA MÓDSZEREIVEL

Szarka Ágnes

Pécsi Orvostudományi Egyetem, Pécs

Biofizikai Intézet

1998

A program megnevezése:

Biokémia és molekuláris biológia

Programvezető:

Dr. Sümege Balázs, egyetemi tanár

Az alprogram megnevezése:

Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata  
biofizikai módszerekkel

Alprogramvezető:

Dr. Somogyi Béla, egyetemi tanár

*Ezúton mondok köszönetet Dr. DAMJANOVICH SÁNDOR akadémikusnak, aki pályám kezdetekor lehetővé tette, hogy a DOTE Biofizikai Intézetében dolgozhattam.*

*Köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. SOMOGYI BÉLA egyetemi tanárnak, a POTE Biofizikai Intézet igazgatójának a szakmai irányításért, az eredmények interpretálásában nyújtott segítségért, értékes tanácsaiért.*

*Köszönöm Dr. LAKOS ZSUZSA és Dr. NYITRAI MIKLÓS tudományos munkatársak által nyújtott együttműködő segítséget mind a kísérletek kivitelezésében, mind az eredmények interpretálásában.*

*Külön köszönöm BRUNNER JÁNOSNÉ és KÁRPÁTI JÁNOSNÉ asszisztenseknek a laboratóriumi munkában nyújtott segítséget.*

*Köszönettel tartozom a DOTE és a POTE Biofizikai Intézet VALAMENNYI DOLGOZÓJÁNAK, akik hasznos észrevételeikkel és támogatásukkal elősegítették értekezésem elkészítését.*

## TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	4
1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1. Az intramolekuláris fehérjedinamika tanulmányozására alkalmas módszerek áttekintése.....	7
2.2. A fluoreszcencia kioltás elmélete.....	15
2.3. A glikogén foszforiláz enzim.....	20
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	26
3.1. Enzimek és egyéb anyagok jellemzése.....	26
3.2 A fluoreszcencia kioltás.....	27
3.3. Fluoreszcencia anizotrópia meghatározása.....	28
3.4. Fluoreszcencia élettartam meghatározása.....	29
3.5. Rezonancia energia transzfer hatásfokának meghatározása.....	31
3.6. Foszforeszcencia élettartam meghatározása.....	34
4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	36
4.1. A dinamikus és sztatikus fluoreszcencia kioltási állandók szétválasztására alkalmas “steady - state” módszer.....	36
4.2. Allosztérikus ligandok hatása a foszforiláz <i>b</i> enzim intramolekuláris dinamikájára.....	45
4.3. A foszforiláz <i>b</i> enzim aktív centrumának lokális dinamikája.....	56
5. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	72
6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBE TARTOZÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	74
6.1. Az értekezés témakörébe nem tartozó saját közlemények.....	74
6.2. Poszterek, előadások.....	75
7. HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK.....	78

## 1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

A fehérjék aminosavakból felépített makromolekulák, amelyeknek központi szerepük van az élő szervezetek strukturális sajátságainak kialakításában és létfunkcióinak fenntartásában. A fehérjék csoportjába tartoznak az enzimek, amelyek szelektív módon katalizálják az egyes biokémiai folyamatokat. A természetben lassan, gyakran *“in vitro”* körülmények között nem észlelhető sebességgel lejátszódó folyamatok sebességét számottevően, 8-12 nagyságrenddel növelik meg (Koshland, 1968) azáltal, hogy a kívánt kémiai reakció aktivációs energiáját csökkentik. Az enzimek működésével kapcsolatosan mindmáig igen sok a megválaszolatlan kérdés. Nincs még kielégítő válasz az enzimek nagyfokú specifikus működésére. Továbbá nem tisztázott még, hogy mi a magyarázata annak, hogy az enzimek általában óriás- molekulák, amelyeknek a katalitikus centruma, és a különböző ligandok kötőhelye a fehérjemolekula kis hányadát teszik ki. Nem pontosan ismert az sem, hogy mi a szerepe az aktív kötőhelytől távol lévő aminosavrészeknek; milyen a kapcsolat az enzimmolekulák dinamikája és funkciója között. Az az elképzelés, hogy az egész fehérjemolekulának csupán az aktív centrum háromdimenziós szerkezetének stabilizálása a feladata, túlhaladottá vált. Működése során gyakorlatilag minden enzim konformációs változásokon megy keresztül. Ebből következik, hogy az enzimek működésének szabályozásának megismerése céljából igen nagy jelentősége van a konformációs állapotok, valamint a különböző konformációs állapotok közötti átmenetek tanulmányozásának. A végső cél ezen állapotok lehető legrészletesebb jellemzése mellett az, hogy a konformációs állapotok és az azok közötti átmenetek, valamint az enzimek funkcionális sajátságai közötti kapcsolatot tisztázni lehessen. Ilyen célra számos kísérleti módszer áll rendelkezésre (pl.: ESR, NMR, CD és ORD, IR- lumineszcencia-spektroszkópia, proteolitikus vizsgálatok, izotópcsera technika stb.).

Munkám során a fehérjék nanoszekundumos, valamint az annál hosszabb időskálán lejátszódó szerkezeti fluktuációjának vizsgálatára alkalmas lumineszcenciás technikákat alkalmaztam.

Célul tűztük ki, hogy az enzimműködés szempontjából különösen fontos nanoszekundumos időskálájú fluktuációs jelenségek tanulmányozására alkalmazható

fluoreszcencia spektroszkópiás módszereket továbbfejlesztjük. Kísérletet tettünk egy "steady-state" fluoreszcencia spektroszkópiás módszer kidolgozására, melynek segítségével a dinamikus és sztatikus kioltási állandók szétválaszthatók. A módszer "steady-state" fluoreszcencia intenzitás és anizotrópia mérés szimultán alkalmazásán alapszik.

A foszforiláz *b* enzim allosztérikus ligandjainak kötődése során bekövetkező lokális, ill. globális konformáció-változásokat a lumineszcencia spektroszkópia módszereinek alkalmazásával kívántuk követni.

A glikogén foszforiláz enzim aktív centrumára vonatkozó és jelenleg még nem tisztázott kérdés, hogy milyen módon képzelhető el a koenzimnek és mikrokönyezete konformációjának közvetlen részvétele a katalitikus folyamatban Ennek megfelelően megpróbáltunk közvetlen kísérletes adatok alapján információt szerezni a foszforiláz *b* aktív centrumának lokális dinamikájáról. Meg kívántuk vizsgálni, hogy kisméretű molekulák mozgását a fehérjestruktúra által kialakított környezetben milyen tényezők határozzák meg. Erre az aktív zsebben kötött és fluoreszcens sajátságokkal rendelkező koenzim, a piridoxál-5'-foszfát (PLP) adott lehetőséget, aminek fluoreszcencia kioltását tanulmányoztuk anionos ( $I^-$  és  $IO_3^-$ ) kioltókkal. Előzetes vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a kioltási kísérletek Stern-Volmer ábrázolása eltér a tipikus eseteket leíró lineáristól. A kioltási görbe analizésére kidolgoztunk egy modellt, melynek segítségével a PLP fluoreszcenciájának anionos kioltókkal történő kioltási folyamata a valósághoz közelebb álló módon jellemezhető.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Az intramolekuláris fehérjedynamika tanulmányozására alkalmas módszerek áttekintése

A fehérjék háromdimenziós szerkezetére, és azok aktív centrumának konformációjára vonatkozó ismereteink sokáig főként röntgenkristallográfias vizsgálatokból származtak. Ezek az információk egyensúlyi állapotokat tükröznek, és kevésbé alkalmasak arra, hogy belőlük a fehérje funkcionális paramétereit, kinetikai állandóit megjósoljuk. Napjainkban már általánosan elfogadott az a nézet, hogy a fehérjék nem rigid, sztatikus szerkezettel rendelkező makromolekulák, hanem különböző szinteken fellépő, különböző amplitúdójú és frekvenciájú intramolekuláris mozgások eredője által meghatározott dinamikus szerkezettel rendelkeznek (Ringe és Petsko, 1985; McCammon és Harvey, 1987). A konformációs állapotok közötti folyamatos átmenetek - a konformációs fluktuációk - a fehérjék alapvető tulajdonságát jelentik. E belső fluktuációk széles időskálán változva kb. 15 nagyságrendet ölelnek fel,  $10^{-15}$  sec-től óráig terjedhetnek, s mintegy 0.01 Å-től 10 Å-nyi elmozdulást jelentenek (Careri és Gratton, 1986; McCammon és Harvey, 1987). Ezeket a belső mozgásokat amplitúdójuk és időtartamuk szerint három nagy csoportba lehet sorolni (Petsko és Ringe, 1984). Az első csoportba az atomi fluktuációk, vibrációk, valamint a kisméretű, közel gömb alakú atomcsoportok kötések menti rotációi tartoznak. Ezek a mozgások véletlenszerűen bekövetkező,  $10^{-11}$  sec-nál kisebb relaxációs idővel jellemezhető gyors mozgások, amplitúdójuk 0.01-1 Å-ig terjed. A második kategóriába sorolhatók a kovalens kötéssel összekapcsolt atom-csoportok kollektív mozgásai, amik lehetnek ritkán bekövetkező, gyors mozgások (pl. belső aromás gyűrűk "flipp-flopp" mozgása). A kollektív mozgások ugyanakkor lehetnek nagyon lassúak is, mint pl. a polipeptid lánc egy szegmensének kitekeredése ("unfolding"). Ezen kollektív mozgások amplitúdója 0.01-5 Å-ig, ideje pedig  $10^{-12}$ - $10^{-3}$  s-ig terjed. A harmadik kategóriát a makromolekulán belüli oldallánccok, vagy nagyobb részeinek, mint pl. hurok, szegmens, domének, szubdomének mozgásának hatására bekövetkező konformációs változások képezik. Az ilyen típusú mozgások amplitúdója gyakran eléri vagy meg is haladja a 10 Å-t, ideje pedig  $10^{-9}$  s-tól

akár óráig terjedő széles időtartományt fog át. E folyamatok általában valamilyen specifikus stimulusra adott válaszként jönnek létre (Perutz, 1970; 1979).

Az első közvetlen bizonyíték a fehérjék dinamikus viselkedésére abból a megfigyelésből származott, hogy a fehérjék belső csoportjai véges sebességgel képesek reagálni a megfelelő reagensekkel. Az ilyen reakciókból származó információk interpretálása gyakran komoly nehézségekbe ütközött, mivel az alkalmazott reagens nem-specifikusan kötődhet a fehérjéhez, a fehérjék felszíni csoportjaival gyorsabban reagálhat, vagy pedig megváltoztathatja a fehérje konformációját. Ebből a szempontból áttörést hoztak a hidrogén-kicserélődési módszerek. Ezek a módszerek azon alapulnak, hogy a fehérjemolekulában lévő hidrogéneknek a fehérje oldatához adott deutérium (vagy trícium) atomjaival való kicserélődése a hidrogén kötésének természete szerint igen nagy különbségeket mutat. A hidrogén-kicserélődési vizsgálatok a polipeptidláncban résztvevő H-hidak különböző sebességgel kicserélődő osztályait tudják megállapítani. Így például a savas és bázikus csoportok hidrogénjei pillanatszerűleg cserélődnek ki. A peptidkötések NH-jának hidrogénjei viszont mérhető véges sebességgel cserélődnek le (Englander és mtsai, 1972; Woodward és Hilton, 1979; Woodward és mtsai, 1982; Englander és Kallenbach, 1984). Az imino-hidrogének kicserélődésének sebességében jól mérhető különbségek vannak ezen csoportok elhelyezkedése, valamint az általuk létrehozott hidrogénhidak stabilitása szempontjából. A fehérjék dinamikus viselkedésének tanulmányozására elsőként Hvidt és Linderstrom-Lang (Hvidt és Linderstrom-Lang, 1954) alkalmazták a hidrogén-kicserélődési módszert. A hidrogén-kicserélődési vizsgálatok modern észlelési módszere az infravörös (IR) spektroszkópia. Az N-H és N-D kötések rezgési frekvenciája között a deutérium atom kétszeres tömege miatt jelentős különbség van. A kicserélődés kinetikája követhető továbbá  $^1\text{H-NMR}$  technikával (Hilton és Woodward, 1978; Griffey és mtsai, 1985), mivel a  $^1\text{H}$  atom NMR jelet ad, a  $^2\text{H}$  atom viszont nem, vagy neutrondiffrakciós módszerrel a hidrogén és a deutérium magjának eltérő neutron-szórási faktora alapján (Kossiakoff, 1985; Wlodawer és Sjölin, 1982). Annak ellenére, hogy az izotóp kicserélődési technikát elterjedten alkalmazzák a fehérjék dinamikai sajátságainak vizsgálatára, még mindig nincs teljes egyetértés abban, hogy a kicserélődés milyen mechanizmus szerint zajlik le, és hogy milyen dinamikai fluktuációk felelősek a belső, eltemetett csoportok izotóp kicserélődéséért. Annak értelmezésére, hogy a kicserélődés első lépése hogyan zajlik,



vagyis a kicserélendő proton hogyan válik hozzáférhetővé az oldószer számára, többféle magyarázat is létezik.

Az ún. penetrációs modell szerint az oldószer molekulái behatolnak a fehérje belsejébe azokon az átmenetileg képződő lyukakon keresztül, melyeket a fehérje kis amplitúdójú szerkezeti fluktuációi hoznak létre, és a izotóp-kicserélődés tulajdonképpen a fehérje belsejében történik (Knox és Rosenberg, 1980; Woodward és Hilton, 1980).

A másik modell az ún. helyi kitekeredés ("local unfolding"), miszerint a kicserélődés az oldószerben zajlik úgy, hogy a fehérje kisebb régiói, H-kötések felszakadása közben, kooperatív módon kitekerednek, mintegy kifordulnak, és közvetlen kapcsolatba kerülnek az oldószerral (Englander és mtsai, 1972; Englander és Manuel, 1972; Englander és Rolfe, 1973; Englander, 1975; Englander és Kallenbach, 1984). A fehérjék bizonyos részletei e folyamat során elvesztik natív szerkezetüket. Mindkét elmélet alátámasztására találunk példákat az irodalomban.

Annak ellenére, hogy a kicserélődés mechanizmusának megvalósulási formája még ma sem teljesen tisztázott, ez a módszer ma már igen jelentős eszközzé vált mind a fehérjék, mind nukleinsavak "lassú" szerkezeti fluktuációinak vizsgálatában.

Itt kell megemlíteni a proteolitikus módszereket, amik közvetve ugyan, de információt szolgáltatnak a fehérjék flexibilitásáról. A fehérjebontó enzimek működéséhez szükséges, hogy a peptidlánc egy jelentős szakasza annyira flexibilis legyen, hogy a proteolitikus enzim aktív centrumába be tudjon illeszkedni. Ennek megfelelően a proteolitikus enzimek a denaturált fehérjéket nagy sebességgel hasítják, a natív fehérjék lebontása pedig általában nehezebb. Vannak olyan fehérjék, amelyek teljes mértékig ellenállnak a fehérjebontó enzimeknek. Más fehérjéknek viszont csak jól körülírt részletei (esetleg egyetlen peptidkötése) hasíthatók natív állapotban. Ez az úgynevezett limitált proteolízis. A limitált proteolízis segítségével felvilágosítás nyerhető arról, hogy a fehérjemolekula mely részei azok, amelyek viszonylag flexibilisek, és melyek merevebbek. A proteolitikus hasíthatóság változása a fehérjemolekulának kis molekulákkal (pl.: az enzimek ligandjainak (szubsztrátok, aktivátorok, inhibitorok)) való asszociációjakor felvilágosítást adhat a konformációnak a kötés következtében fellépő változásáról. Példaként említhető Dombrádi és munkatársainak vizsgálata, miszerint a foszforiláz *b* enzimben az aktivátor (AMP) kötődése, ill. a szerin aminosav (Ser 14)

foszforilása hatására bekövetkező konformáció változás hasonló (Dombrádi és mtsai, 1983).

A fehérjék dinamikus viselkedésének vizsgálatára alkalmas módszerek közül fontos szerepe van a különböző spektroszkópiás módszereknek. A különböző atomok kovalens kötéseit mentén végbemenő  $6 \times 10^{12} - 10^{14} \text{ s}^{-1}$  frekvencia tartományba eső atomi vibrációk az infravörös (IR), valamint Raman spektroszkópia módszereivel detektálhatók (Susi, 1972; Tobin, 1972; Krim és Bandekar, 1986; Surewicz és Mantsch, 1988).

Az utóbbi időben nagy jelentőségre tett szert az ESR spektroszkópia módszereinek alkalmazása a fehérjék dinamikai sajátságainak vizsgálatában. A fehérjék konformáció vizsgálatára a fehérjéhez stabil szabad gyököt tartalmazó reagenst kötnek. A fehérjéhez kovalensen kötött spinjelölő rezonanciájának helye és intenzitása jelentősen eltolódik a szabad reagens ESR spektrumához képest. Ebből az eltolódásból a spinjelölőnek a fehérjemolekula egészéhez viszonyított mozgékonyására lehet következtetni. Ha egy spinjelölővel ellátott fehérjemolekula valamilyen behatásra konformációváltozást szenved, ezáltal a spinjelölőt hordozó csoport mozgékonyasága megváltozhat, nőhet vagy csökkenhet (Griffits és mtsai, 1976).

A fehérjék gyors, nanoszekundumos időskálán lejátszódó szerkezeti fluktuációinak vizsgálatára igen alkalmasak a "steady-state" és időfüggő fluoreszcencia spektroszkópiás módszerek (a fluoreszcencia depolarizáció, a fluoreszcencia kioltás, a Förster-típusú rezonancia energia transzfer mérése). A fluoreszcencia a fehérjékben származhat a fehérjét felépítő aromás aminosavaktól (triptofán, tirozin, fenilalanin); a fehérjéhez kovalensen, vagy nem kovalensen kapcsolódó ligandoktól (pl.: porfirin,  $\text{NAD}^+$ , FMN, FAD, piridoxál-5'-foszfát, stb.), illetve külső fluoreszcens próbától, melyek a fehérjékhez kapcsolódva fluoreszcenssé teszik azokat (dansil-, fluorescein-, kumarin származékok és egyéb festékek). Ezen fluorofórok gerjesztett állapotának 1 és 10 ns közé eső élettartama lehetővé teszi, hogy betekintést nyerjünk a fehérjeszerkezeten belüli, ezen az időskálán lejátszódó jelenségekbe. Ilyen jelenség lehet például a fehérjékben található fluorofórok fluoreszcenciájának kioltása a fehérjemátrix környező csoportjaival, vagy a külső kioltó molekulákkal, mely sugárzásmentes legerjesztődéshez vezet. A fluoreszcencia kioltás, mint módszer segítségével számos értékes információ nyerhető a fluorofór csoportokat tartalmazó vagy azokkal jelzett biológiai makromolekulák (fehérjék, nukleinsavak), ill. komplexek, micelláris rendszerek

szerkezetéről, és annak változásairól, a fluorofór csoportok lokalizációjáról (Matkó és mtsai, 1980; Somogyi és mtsai, 1984), mozgásáról, mikrokozonyzetük minőségéről, makromolekula-oldószer kölcsönhatásokról, valamint a különböző objektumokban a lokális fluorofór koncentrációjáról (Eftink és Ghiron, 1976a, b; Lakowicz, 1980; Lakowicz és Weber, 1980; Lakowicz és mtsai, 1983; Lakowicz, 1983; Somogyi és Lakos, 1993). A "steady-state" és időfüggő fluoreszcencia anizotrópia mérések lehetőségét adnak az egyes aromás oldalláncok fehérjemátrixon belüli mobilitásának vizsgálatára (Hansen és mtsai, 1992; Lakowicz, 1991; Lakowicz és mtsai, 1992). A Förster-típusú rezonancia energia transzfer mérése segítségével alkalmasan kiválasztott donor-akceptor pár közötti távolság, valamint a távolságban bekövetkező változások detektálhatók (Haas és mtsai, 1975, 1978; Lakowicz és mtsai, 1987, 1990). A makromolekulák lokális fluktuációjának vizsgálatára Somogyi és munkatársai (1984, 1998) kidolgoztak egy Förster-típusú rezonancia energia transzfer mérésen alapuló módszert. E módszer szerint az energia transzfer hatásfokának a donor kvantumhatásfokával normált értékének hőmérséklet-függése információt szolgáltat a donor és az akceptor molekula közötti fehérjemátrix flexibilitásáról.

A szobahőmérsékletű foszforeszcenciát oldatfázisú fehérje mintában elsőként Saviotti és Galley (1974) mutattak ki. Később, ahogyan a detektálás érzékenységet sikerült növelni, valamint a vizsgálandó fehérje mintákból az oldott oxigént eltávolítani több fehérjénél is kimutattak foszforeszcencia emissziót (Strambini és Gabellieri, 1987; Englander és mtsai, 1987). Mivel a foszforeszcencia emisszió során a legerjesztődés az alacsonyabb energiájú triplett állapotból szinglett állapotba - tiltott átmenet révén - valósul meg, a foszforeszcencia élettartam meghaladja a fluoreszcencia élettartamot, ezáltal lehetővé teszi a nagy amplitúdójú, lassú mozgások detektálását a fehérjékben. A fehérjékben található Trp csoportok foszforeszcencia élettartama szobahőmérsékleten, vizes fázisú mintákban 0.5-2000 ms-ig terjed (Vanderkooi és mtsai, 1987; Strambini és mtsai, 1985). Napjainkban a fehérjékből származó, Trp csoportok által emittált foszforeszcencia mérése kiváló eszközzé vált a fehérjék intramolekuláris dinamikájának követésére, valamint a Trp csoportok mikrokozonyzete flexibilitásának tanulmányozására. A kromofór foszforeszcencia élettartamának és közonyzete mikroviszkozitásának szoros kapcsolata különösen alkalmassá teszi a foszforeszcencia élettartamot, hogy információt nyerjünk a kromofór közonyzetének dinamikai

sajátságairól, valamint az abban bekövetkezett változásokról. Strambini és munkatársai által leírtak szerint a Trp csoportok környezetében a mikroviszkozitás csökkenése a foszforeszcencia élettartam csökkenését eredményezi (Strambini és Gonnelli, 1985; 1995).

Frauenfelder és munkatársai a klasszikus értelemben "sztatikus" szerkezetvizsgálatra alkalmazott röntgendiffrakciós módszert használták fel a fehérjedinamika vizsgálatára. Ezzel a továbbfejlesztett módszerrel (Frauenfelder és mtsai, 1979), ami a hőmérsékleti vagy Debye-Waller faktornak (B-faktor) - amely a szórócentrumnak a szórósíkra merőleges "átlagos négyzetes elmozdulásával" arányos - széles hőmérsékleti tartományban történő megfigyelésén alapul, lehetőség nyílt arra, hogy az atomi vibrációk, ill. konformációs fluktuációk hozzájárulása szeparálható legyenek (Ringe és Petsko, 1985). Ezt a módszert sikeresen alkalmazták kis és közepes méretű fehérjék dinamikájának vizsgálatára. Megállapították, hogy a vizsgált fehérjékben az átlagos négyzetes elmozdulás jelentősen növekszik a fehérje felszine felé haladva, és különösen jelentős az aktív centrum környékén, valamint a nagyobb méretű szubsztrát molekulák kötőhelyeinél. Később megpróbálkoztak a neutrondiffrakció hasonló céllal történő alkalmazásával (Kossiakoff, 1982).

Ide tartozóan meg kell említeni az NMR spektroszkópiával elért eredményeket (Kaptein és mtsai, 1985; Cavanagh és mtsai, 1995; Kay és Gardner, 1997; Palmer, 1997). Ezen módszer segítségével lehetőség nyílt a fehérjeszerkezet belsejében lezajló nagyfrekvenciájú mozgások közvetlen megfigyelésére. A magnészes rezonancia (NMR) mérések segítségével oldatban nemcsak a fehérjék dinamikus fluktuációi, hanem háromdimenziós szerkezetük is vizsgálható (Roder és mtsai, 1988). NMR segítségével a fehérjék belső mozgásai több paraméter alapján is követhetők: a relaxációs idő, a sávszélesség, a sáveltolódás, vagy a sávatak, kötéseken keresztüli, vagy kötéshez nem kapcsolt téren keresztüli csatolási állandókból (Nuclear Overhauser Effect, NOE) egyaránt nyerhetők információk (Hoch és mtsai, 1985; Ferretti és Weis, 1989). A NOE két egymástól legfeljebb 5 Å távolságra lévő spin nukleon között ható dipol-dipol csatolás következménye. Ebben az esetben az atomok nem ugyanabban a reziduumban vannak, csak a téren keresztül állnak kapcsolatban egymással. A téren keresztüli csatolási állandó a két nukleon közötti távolság hatodik hatványa szerint csökken. A relaxációs paraméterek egyaránt érzékenyek a fluktuációk frekvenciájára, amplitúdójára és

segítségükkel a belső mozgások széles frekvencia-tartománya ( $10^6$ - $10^{12}$  s<sup>-1</sup>) vizsgálható (Jardetzky, 1981).

A legutóbbi évek további előrelépését a két, vagy akár többdimenziós (2D, 3D, 4D) korrelált NMR spektroszkópia (COSY), illetve továbbfejlesztett változatai hozták, amelyek az átfedő rezonancia-sávok felbontását az újabb dimenziókban jelentősen megnövelték (Wright, 1989; Bax 1994). Emellett a heteronukleáris (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>19</sup>F, <sup>31</sup>P) NMR vizsgálatokat is egyre gyakrabban használják (Parraga és Klevit, 1991; Zhang és mtsai, 1994). NMR vizsgálatokkal viszonylag kis mőtömegű fehérjék vizsgálhatók. A <sup>1</sup>H homonukleáris NMR vizsgálatokkal ~10 kDa-os, a <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N heteronukleáris NMR-rel a ~30 kDa-os, míg a részlegesen deuterált mintáknál alkalmazott heteronukleáris NMR spektroszkópiával ~40-50 kDa-os makromolekulák is tanulmányozhatók.

A neutron- és röntgensugárzás biológiai makromolekulák által okozott kis-szögű szórásának detektálásával a makromolekulák alakjáról, az abban bekövetkezett változásokról nyerhetünk információt (Stuhrmann és Miller, 1978; Trehella, 1997). Mivel a szórási paraméterek nagymértékben függenek a molekulák geometriájától, így különösen érzékeny a domének orientációjának megváltozására, a makromolekulák flexibilitására, valamint az asszociációs folyamatokra. Ezzel a módszerrel viszonylag kis fehérje komplexek (~50 kDa) tanulmányozhatók. A módszer előnye, hogy a makromolekulák vizes fázisban, és viszonylag kis koncentrációban tanulmányozhatók. Ezzel a módszerrel vizsgálták pl. a DnaK hő-sokk fehérjét. Kimutatták, hogy a fehérje két doménből áll. Az N-terminális domén az ATP-kötő domén, a C-terminális domén pedig a szubsztrát kötéseért felelős. A módszerrel kimutatták, hogy ATP kötés hatására a fehérje hosszirányban megnyúlik, míg a szubsztrát kötődésének hatására a molekula rövidül, mivel a szubsztrát kötődése egy mélyedésben, vagy egy zsebben történik (Shi és mtsai, 1996). Neutron szórási vizsgálatokkal tanulmányozták pl. a Troponin C izomfehérjét, és annak kölcsönhatását a Troponin I-vel. A szórási adatok azt mutatták, hogy a Troponin C molekula nyújtott állapotban marad, amikor összekapcsolódik a Troponin I-vel (Olah és Trwhella, 1994).

Az atomerő mikroszkópia (Atomic Force Microscopy, AFM) (Binnig és mtsai, 1986; Rugar és Hansma, 1990) alkalmazása lehetővé teszi a biológiai rendszerek széles spektrumának vizsgálatát atomi méretekől a mikronos nagyságrendig (Bustamante és mtsai, 1997). Ezzel a technikával a sejtmembrán, kromoszómák, fehérjék, nukleinsavak

vizsgálhatók. Két típusa ismert a pásztázás megvalósítása szerint, az egyik a "contact", a másik pedig a "tapping" mód, amikor a tűt tartó konzolt vertikális irányban rezegtetik miközben a tűt a mintán futtatják. Ebben az esetben a molekula képét a rezgés amplitúdójának változásából alkotják meg. Az atomerő mikroszkópia laterális felbontóképességét az alkalmazott tű mérete határozza meg, viszont a vertikális felbontóképesség szub-nanométeres nagyságrendű, és ennek csak a detektor, valamint a konzolos tartó érzékenysége szab határt.

Az atomerő mikroszkópia továbbfejlesztése vizes fázisú mintákban lehetővé tette a biológiai folyamatok követését fiziológias körülmények között. Ezzel a módszerrel vizsgáltak pl. a membránban kötött E. coli F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP szintáz szerkezetét, és annak megváltozását tripszinnel történő hasítás után (Sing és mtsai, 1996; Takeyasu és mtsai, 1996). Jenei és munkatársai (1997) sikeresen alkalmazták ezt a technikát a sejtfelszíni fehérjekomplexek vizsgálatára. Kimutatták, hogy a sejtfelszíni receptor mintázat nem véletlenszerű, hanem az antigének és maguk az asszociátumok (cluster) is kapcsolatban állnak egymással. Több fehérjének (pl.: immunoglobulin G, urease stb.) a vertikális irányú fluktuációját detektálták vizes fázisban (Thomson és mtsai, 1996). Ezzel a technikával vizsgálták a titin órásféhére egyik szegmensének megnyújtás hatására bekövetkező kitekeredését ("unfolding") (Rief és mtsa. 1997).

A technika felbontóképességének növelésénél problémát jelentett szobahőmérsékleten a minták "puhasága", ugyanis a tű méretének csökkentésével a minta és a tű érintkezési felületénél egyre nagyobb erők ébrednek, ami gyakran a minta deformálódásához, vagy roncsolódásához vezetett. Ezt a problémát kerülték ki a cseppfolyós nitrogén alatti minták vizsgálatával (cryo-AFM) (Zhang és mtsai, 1996).

A fehérjék szerkezeti fluktuációinak fokozatos megismerése elvezetett a klasszikus enzimmodellek átértékeléséhez, s lehetővé tették különböző dinamikus enzimmodellek felállítását (Cerei és mtsai, 1975; Gurd és Rothgeb, 1979; McCammon és Karplus, 1980; Karplus és McCammon, 1981; Welch és mtsai, 1982; Damjanovich és mtsai, 1983; Somogyi és mtsai, 1984), amelyek kiemelkedő funkcionális jelentőséget tulajdonítanak az enzimmolekulák sajátságos - térben és időben statisztikusan rendezett - fluktuációs "mintázatának". Ezen modellek megengedik, vagy feltételezik, hogy a fehérjedinamika komoly szerepet tölthet be az intra- és intermolekuláris információtranszferben olyan értelemben, hogy a makromolekulák egymástól távoli

pontjai dinamikus karakterük módosításával válaszolnak más pontokon bekövetkezett lokális kölcsönhatásokra (Závodszy, 1981a, b).

## 2.2. A fluoreszcencia kioltás elmélete

Bármely folyamatot, amely adott fluoreshkáló anyag fluoreszcencia intenzitásának csökkenéséhez vezet, fluoreszcencia kioltásnak nevezzük. Különböző, egymástól független folyamatok eredményezhetnek fluoreszcencia kioltást. Ezek a mechanizmus szerint két fő csoportba sorolhatók, úgymint diffúziófüggő dinamikus és diffúziótól független ún. sztatikus kioltási folyamatok.

Valamennyi kioltási folyamat emisszióval, belső konverzióval és a rendszerek közötti ( $S \rightarrow T$ ) ("inter-system crossing") átmenettel vetélkedő reakcióként fogható fel. Mindezen folyamatokat figyelembe véve a fluoreszcencia kvantumhatások ( $\Phi$ ) a megfelelő átmenetek sebességi állandóival a következőképpen fejezhető ki:

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{BK} + k_{ST} + \sum k_i} \quad (1)$$

ahol  $k_F$  a fluoreszcencia átmenet sebességi állandója,  $k_{BK}$  a belső konverzió sebességi állandója,  $k_{ST}$  az "inter-system crossing" sebességi állandója,  $\sum k_i$  a kioltási folyamatok összegzett sebességi állandója.

Az elemi kioltási folyamatok következő típusait különböztethetjük meg (Badley, 1976):

- önabszorpció
- koncentrációs kioltás
- energiatranszfer
- ütközéses kioltás (diffúzió kontrollált)
- sztatikus kioltás (nem diffúzió kontrollált)

Az első folyamat főleg töményebb oldatokban lép fel, jelenléte az optikai úthossz változtatásával detektálható. Ez a folyamat semmilyen információt nem nyújt a vizsgált rendszerről, így a gyakorlatban célszerű elkerülni. A koncentrációs kioltás egy gerjesztett

és egy alapállapotú fluorofór asszociációja révén keletkező dimer (excimer) hatásának tulajdonítható. Az excimer képződése a fluorofór csoport fluoreszcens sajátságainak megváltozásához vezet. Gyakran az emissziós maximum hosszabb hullámhosszak felé történő eltolódása kíséri. A folyamat információt nyújthat az objektumon belüli lokális fluorofór koncentrációról, és a fluorofór diffúziós sajátságairól. Az energiatranszfer dipólusok közötti rezonancia-energia átadás formájában valósul meg, és hatékonyságát nagymértékben befolyásolja az objektumban található fluorofór csoportok (donor, ill. akceptor) spektrális sajátsága, átlagos távolsága és orientációja.

A továbbiakban a külső kioltóval történő ütközéses kioltási módszert tárgyaljuk részletesebben. A gerjesztett állapotban levő fluorofór ( $T^*$ ) gerjesztési energiáját a következő folyamatok során veszítheti el, ha az oldatban kioltó ( $Q$ ) van jelen:



A fent felsorolt folyamatokat jelképező nyilak fölött feltüntettük az egyes folyamatok sebességi állandóit is;  $k_F$  a foton kibocsátásával járó folyamat,  $k_o$  a sugárzásmentes folyamatok összegzett sebességi állandója,  $k_q$  pedig a gerjesztett állapotú fluorofór és a  $[Q]$  koncentrációban jelenlévő kioltó molekula ütközését jellemző bimolekuláris sebességi állandó.

A kioltót nem tartalmazó esetben ( $\Phi_o$ ), illetve a kioltó jelenlétében ( $\Phi$ ) meghatározható kvantumhatásfok a sebességi állandókkal a következő módon fejezhető ki:

$$\Phi_o = \frac{k_F}{k_F + k_o} = k_F \tau_o \quad (2)$$

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_o + k_q[Q]} = k_F \tau \quad (3)$$



ahol  $[Q]$  a kioltó moláris koncentrációja,  $\tau_o = (k_F + k_o)^{-1}$ , ill.  $\tau = (k_F + k_o + k_q[Q])^{-1}$  a fluoreszcencia élettartamok a kioltót nem tartalmazó rendszerben, ill. a kioltó jelenlétében.

A (2) és (3) összefüggésekből következik, hogy

$$\frac{\Phi_o}{\Phi} = \frac{\tau_o}{\tau} = \frac{k_F + k_o + k_q[Q]}{k_F + k_o} = 1 + \frac{k_q[Q]}{k_F + k_o} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (4)$$

Mivel a "steady-state" fluoreszcencia intenzitás arányos a fluoreszcencia kvantumhatásfokkal, a (4) egyenlet a következőképpen is felírható:

$$\frac{F_o}{F} = 1 + k_q \tau_o [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (5)$$

ahol  $F_o$  és  $F$  a kioltót nem tartalmazó, illetve tartalmazó rendszer által emittált "steady-state" fluoreszcencia intenzitás. Az (5) összefüggést az ún. klasszikus Stern-Volmer egyenletnek, a benne szereplő  $K_{sv}$  állandót pedig kioltási (vagy Stern-Volmer) állandónak szokás nevezni (Stern és Volmer, 1919). A dinamikus ütközéssel kioltás az ún. *kaliika* hatás ("cage effect": North, 1964) következtében a fluorofór és a kioltó molekula között képződő ütközési komplex keletkezése révén valósul meg.

Különböző koncentrációjú kioltó jelenlétében mért  $F_o/F$  értékeknek a kioltó koncentrációjától való függése lineáris, ha a valóságban is a fenti folyamatok játszódnak le. Az egyenes meredeksége a  $K_{sv}$  állandó értékével egyezik meg, amelyből a fluoreszcencia élettartam ( $\tau_o$ ) ismeretében a fluorofór és a kioltó molekula ütközését jellemző bimolekuláris sebességi állandó, a  $k_q$  számolható (lásd 5. egyenletet).

Amennyiben a kioltás határfoka kisebb 1-nél, a  $k_q$  tartalmaz egy tényezőt, amely a kioltó és a fluorofór molekula közötti ütközések hatékonyságára jellemző faktor ( $0 < \gamma \leq 1$ ).

$$k_q = \gamma k_q \quad (6)$$

Abban az esetben, amikor  $\gamma \approx 1$  erős kioltókról, ha egynél kisebb, gyenge kioltókról beszélhetünk. Gyenge kioltók esetében a gerjesztett állapotú fluorofór és a kioltó ütközési komplexe disszociál még mielőtt a kioltás bekövetkezne.

Ha figyelembe vesszük az alkalmazott kioltó molekula átlagos méretét, és azt, hogy  $\tau_o$  nanoszekundum nagyságrendű, a  $k_q$  a fluorofór és a kioltó közötti relatív transzfer sebességről tudósít. Ha a kioltás a fehérjemolekula belsejében történik, a  $k_q$ -a

fehére mátrix belső dinamikájával van kapcsolatban (Somogyi és mtsai, 1994; Eftink és Ghiron, 1975).

A  $k_+$  sebességi állandó első közelítésben a következő mennyiségek függvényeként írható fel (Eftink és Ghiron, 1976):

$$k_+ = 4\pi D R N_A' \quad (7)$$

ahol  $D$  a reaktánsok diffúziós állandóinak összege,  $R$  a reaktánsok molekulasugarainak összege,  $N_A'$  pedig a millimoláris Avogadro-szám.

Több fluorofórt tartalmazó fehérjékben, ezen fluorofórok különböző mikroköznyezetben helyezkednek el, ezért bizonyos mértékben eltérő fluoreszcenciás jellemzőkkel rendelkezhetnek. Attól függően, hogy a fluorofór hol helyezkedik el, lehet részlegesen vagy teljesen exponált, vagy teljesen maszkírozott. Az ionos kioltók (pl.:  $I^-$ ,  $IO_3^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $Br^-$ ,  $Cs^+$ ) töltéssel rendelkező erősen hidratált részecskék lévén, csak azon fluorofórok emisszióját képesek kioltani, amelyek a fehérjemátrix felszínén, vagy ahhoz közel helyezkednek el. Ha  $\alpha$  ( $0 < \alpha < 1$ ) jelöli a kioltható fluoreszcencia hányadot, akkor létezik olyan fluoreszcencia hányad ( $1-\alpha$ ), ami nem oltható ki még végtelen nagy kioltó koncentráció esetén sem. Ebben az esetben az (5) egyenlet módosított formája érvényes (Lehrer, 1971).

$$\frac{F_o}{F_o - F} = \frac{F_o}{\Delta F} = \frac{1}{\alpha} + \frac{1}{\alpha K_{sv} [Q]} \quad (8)$$

Az  $F_o/\Delta F$  mennyiséget az  $1/[Q]$  függvényében ábrázolva egyenest kapunk, a tengelymetszetből valamint a meredekségből az  $\alpha$  és a  $K_{sv}$  meghatározható.

Általánosabb tárgyalásmódot választva megengedhetjük, hogy a gerjesztés pillanatában a kioltó komplexet képezzen az alapállapotú fluorofór molekulával is, ami az ún. sötét komplex keletkezését eredményezi. Ebben az esetben, a gerjesztési energiát a gerjesztés pillanatában a fluorofórral éppen komplexben levő kioltó viszi el. Az ilyen típusú fluoreszcencia kioltást sztatikus kioltásnak nevezzük. Következésképpen ez a folyamat a dinamikus kioltáshoz hasonlóan csökkentheti a "steady-state" fluoreszcencia intenzitást. Ennek megfelelően a steady-state mérések egyaránt érzékenyek a sztatikus kioltásra (a sötét komplex jelenléte miatt), és a dinamikus (ütközési) kioltásra is. Ezzel szemben, az élettartam mérések csak a dinamikus kioltást detektálják. Kizárólag

fluoreszcencia intenzitás csökkenésének meghatározásával tehát nem dönthető el a kioltás sztatikus vagy dinamikus jellege. Egyrészt élettartammérések eredményei alapján lehet megállapítani, hogy milyen mechanizmus szerint csökken a fluoreszcencia intenzitás. Dinamikus kioltás esetén  $\tau_o/\tau = F_o/F$ , azaz a kioltó jelenlétében mérhető élettartam csökkenés egyenesen arányos a fluoreszcencia intenzitás csökkenésével, míg ha a sztatikus kioltás dominál,  $\tau_o/\tau \approx 1$ , azaz az élettartam nem változik a kioltó jelenlétében. Másrészt az 7. egyenletből következik, hogy a diffúziós folyamatok sebessége (a diffúziós állandó) a  $T/\eta$  mennyiségével egyenesen arányos, ezért tisztán dinamikus kioltás esetén a kioltási állandónak arányosnak kell lennie az abszolút hőmérséklet és a viszkozitás hányadosával.

Az (5) egyenlet közelítő formája, amely mind a sztatikus, mind a dinamikus kioltást leírja a következő (Vaughan és Weber, 1970):

$$\frac{F_o}{F} = (1 + K_{sv}[Q])(1 + V[Q]) \quad (9)$$

Ebben az összefüggésben az első tényező a dinamikus kioltással kapcsolatos, amikor is a gerjesztett állapotban levő fluorofór a gerjesztési energiáját emisszió nélkül, a kioltó molekulával való ütközés révén veszíti el. A másik tényező, az emisszióra nem képes ún. sötét komplex hatását írja le. Sztatikus kioltás esetén a  $V$  kioltási állandó a  $T+Q = T:Q$  egyensúlyra jellemző egyensúlyi állandót jelenti. Ha mind a sztatikus, mind a dinamikus kioltási komponens jelentős, az  $F_o/F - (Q)$  összefüggés eltér az egyenestől (Eftink, 1983). Akár a dinamikus, akár a sztatikus kioltás elhanyagolható a másikhoz képest, az  $F_o/F - (Q)$  függvény lineáris lesz, és az előzőekben tárgyalt Stern-Volmer egyenlettel írható le.

Abban az esetben, amikor a sztatikus komponens a dinamikus komponens 10 %-a alatt van, a 9. egyenletben a másodrendű tag ( $Q^2$ ) elhagyható és a következő összefüggést írhatjuk fel:

$$\frac{F_o}{F} = 1 + (K_{sv} + V)[Q] \quad (10)$$

A módosított Stern-Volmer egyenlet közelítő formája így a következő:

$$\frac{F_o}{\Delta F} = \frac{1}{\alpha} + \frac{1}{\alpha(K_{sv} + V)} [Q] \quad (11)$$

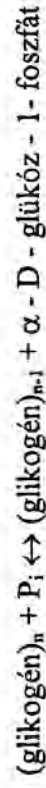
A (10) és (11) egyenletek lehetővé teszik, hogy az esetek többségében "steady-state" fluoreszcencia intenzitások mérésével megkapjuk a  $K_{SV}$  és  $V$  összegét.

Kioltási vizsgálatokra számos, különböző kémiai karakterű anyag használható. Weber és munkatársai töltés nélküli kioltóként a molekuláris oxigént alkalmazták (Vaughan és Weber, 1970; Lakowicz és Weber, 1973). Efink és Ghiron (1975) egy másik töltés nélküli kioltóval, az akrilamiddal végeztek vizsgálatokat. Töltéssel nem rendelkező akrilsav származékokat is alkalmaztak (Ricci és Nesta, 1976).

Szelektív vizsgálatokra alkalmas ionos kioltókat (jodid, jodát, bromid, bromát, nitrát, cézium) is gyakran alkalmaznak fehérjeszerkezeti vizsgálatokra. Mivel ezek töltéssel rendelkező erősen hidratált részecskék, így csak a fehérjék felszínén elhelyezkedő, oldószerrel érintkező fluorofórokkal képesek kölcsönhatásba lépni. A szelektív kioltók alkalmazása lehetővé teszi a fluorofórok lokalizációjának, a fehérjeszerkezeten belüli eloszlásának meghatározására (Matkó és mtsai, 1980; Somogyi és mtsai, 1984), segítségével értékes információt nyerhetünk a fehérjék szerkezetéről, ill. a különböző kölcsönhatások következtében bekövetkezett szerkezeti változásokról (Pelley és Horowitz, 1976).

### 2.3. A glikogén foszforiláz enzim

A glikogén foszforiláz enzim (E.C. 2.4.1.1) fiziológias körülmények között katalizálja a glikogén hasítását, valamint felépítését.



A keletkezett glükóz-1-foszfátnak fontos szerepe van az izomkontrakcióhoz szükséges energia fedezésében, valamint a májban a vércukorszint fenntartásában (Hers, 1976).

A glikogén foszforiláznak két formája létezik a szervezetben (Stalmans, 1976), az egyik a foszforiláz *b*, a másik pedig a foszforiláz *a*. Nyugalmi állapotban lévő izomban főleg a glikogén foszforiláz *b* formája található, a foszforiláz *a* csak kb.: 10 %-ban van jelen. A foszforiláz kináz  $\text{Mg}^{2+}$  és ATP jelenlétében a foszforiláz *b* Ser14 aminosav csoportját foszforilálja, és így kialakul a foszforiláz *a* (Fischer és mtsai, 1958). Az enzim

két formájának enzimaktivitása jelentősen különbözik. A foszforiláz  $\alpha$  önmagában, AMP nélkül is aktív, jöllehet aktivitása AMP jelenlétében 10-20 %-kal emelkedik (Madsen és Withers, 1986). A foszforiláz  $b$  viszont csak allosztérikus aktivátorok (AMP, IMP) jelenlétében mutat aktivitást (Cori, 1938, Helmreich és Cori, 1964). Az enzim aktivitása inhibitorokkal (ADP, ATP, G-6-P, UDPG) gátolható (Kasvinsky és mtsai, 1978). Cori és munkatársai voltak az elsők akik kimutatták, hogy a foszforiláz  $b$  enzim rendelkezik egy specifikus AMP kötőhellyel, azonban ez a nukleotid közvetlenül nem vesz részt a katalitikus reakcióban.

A glikogén foszforiláz alegységének 1 db piridoxál-5'-foszfátot (PLP) tartalmaz (Baranowski és mtsai, 1957), ami Schiff bázison keresztül kapcsolódik a Lys680-as aminosavhoz (Fischer és mtsai, 1958; Titani és mtsai, 1977). A PLP a foszforiláz mindkét formájának prosztetikus csoportja, koenzimje. Röntgenkristallográfias vizsgálatok alapján kimutatták, hogy a PLP az enzimmolekula közepén, a C- és N terminális domén közötti mélyedésben, a katalitikus hely közelében helyezkedik el, a felszíntől mintegy 15 Å távolságra (Weber és mtsai, 1978, McLaughlin és mtsai, 1984, Johnson és mtsai, 1987). Ezen csoport eltávolítása az enzimből, az aktivitás teljes elvesztésével jár, ha viszont az apoenzimet PLP-vel inkubáljuk, akkor az enzim újból aktív lesz (Hendrick és mtsai, 1966; Shaltiel és mtsai, 1969).

A nyúl vázizomból preparált glikogén foszforiláz aminosav sorrendjét 1977-ben Titani és munkatársai határozták meg kémiai módszerekkel, ami fontos szerepet játszott a röntgenkristallográfias eredmények interpretálásában. Az enzim 842 aminosavat tartalmaz. Egy alegység molekulásúlya a PLP-vel együtt 97 434 dalton. A különböző fajokból származó foszforiláz PLP-t kötő helyének aminosavsorrendje homológ, és konzervatív (Fletterick és Madsen, 1981).

A foszforiláz  $b$  röntgenkristallográfias eredmények alapján megállapított szalagmodelljét az 1. ábra mutatja, amit a "WebLabViewer" programmal készítettünk, a Protein Data Bank-ban elérhető koordináták alapján (Johnson és mtsai, 1993). Az enzim szerkezete viszonylag tömör, sugara kb. 30 Å. Az enzim felszíne kb.: 1.4-szer nagyobb, mint ami megjósolható a kisebb méretű fehérjék szerkezetéből. Ez egy általános tulajdonsága a nagyméretű fehérjéknek, ami a domének, szubdomének összekapcsolódásából következik. A foszforiláz egy  $\alpha/\beta$  fehérje. A 19-839 aminosavak

52 %-a  $\alpha$  - hélixben, 20 %-a  $\beta$  - szerkezetben található. Az első 18 csoport és a C-terminális része az enzimnek, rendezetlen struktúrában található.

A krisztallográfias vizsgálatok alegységenként négy ligand kötőhelyet mutattak ki. A katalitikus hely („*site C*”) a molekula közepén helyezkedik el, a két domén találkozásánál, a PLP kötőhely közelében (Johnson és mtsai, 1980; Jenkins és mtsai, 1981). Ide kötődik az enzim egyik szubsztrátja a G-1-P, aminek kötődése csak kis konformációs változást eredményez az enzim szerkezetében. Barford és munkatársai röntgenkrisztallográfias vizsgálatok alapján három csatornát mutattak ki a fehérje felszínétől a katalitikus hely irányába (Barford és mtsai, 1988). Az egyik csatorna a nukleozid inhibitor hely felől a G-1-P -foszfát kötőhelye felé vezet, ennek a csatornának az átjárhatóságát a 280-as aminosavakból álló hurok akadályozza. A csatorna szélessége mintegy 6-8 Å (Weber és mtsai, 1978) mélysége pedig kb. 15 Å, aminek a végén a PLP található. Ezt a mélységet egyrészt röntgenkrisztallográfias eredmények, másrészt számítások alapján határozták meg figyelembe véve azt, hogy a glikogén lebontás az  $\alpha(1-6)$  kötés előtt négy glikozil egységgel leáll (Johnson és mtsai, 1979). A másik csatorna az úgynevezett “PUG” csatorna, aminek az átjárhatóságát ugyancsak akadályozza egy 287-292 aminosavakból álló hurok. Egyes elképzelések szerint a kis méretű szubsztrátok ezen a csatornán keresztül juthatnak be az aktív helyre, amikor a glikogén kötve van a zsebben. Elképzelhetetlen ugyanis, hogy a kisméretű szubsztrátok ugyanazon a csatornán keresztül beférnének a katalitikus csatornába, ami már köti a glikogént. A harmadik csatorna az Arg569-es aminosav, valamint a PLP között vezet. Ez egy nagyon keskeny csatorna, ami két helyen is megtörik. Ezekből a röntgenkrisztallográfias eredményekből kiderül, hogy mindegyik csatorna átjárhatósága kisebb-nagyobb mértékben gátolt. A fehérje konformációs változásaira van szükség ahhoz, hogy ezek a csatornák időlegesen nyitottá váljanak a felszín felé.

Az allosztérikus kötőhely („*site N*”) 32 Å-re van a katalitikus helytől (Stura és mtsai, 1983). Ide kötődnek az allosztérikus aktivátorok (AMP, IMP), ill. inhibitorok (ATP, ADP, G-6-P). A nukleozid inhibitor kötőhely a katalitikus zseb bejáratánál található (Kasvinsky és mtsai, 1978). Minden molekula, ami ehhez a helyhez kötődik az enzim aktivitásának csökkenését eredményezi. Ez a gátlás úgy képzelhető el, hogy az ide kötődő inhibitorok elzárják a szubsztrát útját a katalitikus hely felé. Az inaktív állapotú („*T state*”) enzimben a glikogén nem kötődik a katalitikus helyhez. A glikogén

molekulák az úgynevezett glikogén tároló helyhez kötődnek („site  $G''$ ”), ez a kötőhely 30, ill. 39 Å-re van a katalitikus, ill. az allosztérikus kötőhelytől (Johnson és mtsai, 1983).

A koenzim katalitikus folyamatban betöltött szerepe a mai napig nem teljesen tisztázott. A PLP eltávolítása után különböző módosított koenzimet kapcsoltak az apoenzimhez, és az így létrehozott enzim aktivitását mérték (Madsen és Withers, 1986; Johnson és mtsai, 1989; Palm és mtsai, 1990). Parrish és munkatársai kimutatták, ha piridoxált kapcsolnak az enzimhez, akkor az nem mutat enzimaktivitást, azonban ha az enzim nem kovalensen kötött dianiont, mint pl. foszfátot, vagy foszfítot tartalmaz, az enzim aktivitása 19 %-ig visszaáll (Parrish és mtsai, 1977). Helmreich és Klein (1980) nagyfelbontású  $^{31}\text{P}$  NMR vizsgálatokkal kimutatta, hogy a PLP 5'-foszfát csoportja a natív enzimben mónoanion, aktivált formában pedig dianion lesz. Ezekből a kísérletekből származó eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a PLP 5'-foszfát csoportja vesz részt a katalitikus folyamatban, és csak az az enzim mutatott aktivitást, ahol a PLP analóg kétszeresen negatív töltésű 5'-foszfát csoportot tartalmaz. A röntgendiffrakciós, biokémiai, és NMR vizsgálatok alapján két fő magyarázat alakult ki a PLP 5'-foszfátjának a katalitikus folyamatban betöltött szerepéről. Az egyik szerint a PLP foszfát csoportja a poliszacharid foszfát csoportjával egy sav-bázis reakcióban vesz részt (Feldman és Hull 1977; Helmreich és Klein 1980; Klein és mtsai, 1982; Klein és mtsai 1984). Helmreich és Klein munkacsoportja (Helmreich és Klein, 1980; Klein 1982; Klein és mtsai, 1984)  $^{31}\text{P}$ -NMR adatok alapján olyan mechanizmust javasoltak, amely szerint a PLP 5'-foszfát csoportja protonálódik, s így proton donorként katalizálja a glikozidos kötés hasítását. Az átmeneti glikozil kationt valamely nukleofil csoport (pl.  $-\text{COOH}$ ) stabilizálja. A másik elképzelés szerint a PLP foszfor atomja elektrofil reaktánsként vesz részt a katalitikus folyamatban (Madsen és Withers, 1986). Madsen, Withers és Fukui munkacsoportja a PLP 5'-foszfát csoportjának elektrofil jellegét hangsúlyozzák (Withers és mtsai, 1981, 1982; Takagi és mtsai, 1982). A szubsztrát jelenlétében a PLP dianionos foszfát csoportja elektrofil reaktánsként a szubsztrát foszfát kötéséből elektronokat von el, és ezáltal fellazítja az észterkötést. A  $^{19}\text{F}$  NMR vizsgálatok tanúsága szerint ugyanakkor a koenzim 5'-foszfát csoportjának fontos szerepe lehet a katalízisnél a különböző reaktív csoportok megfelelő orientációjának kialakításában (Chang és mtsai, 1987). Mindkét javasolt mechanizmus megvalósulásához szükséges, hogy a PLP,

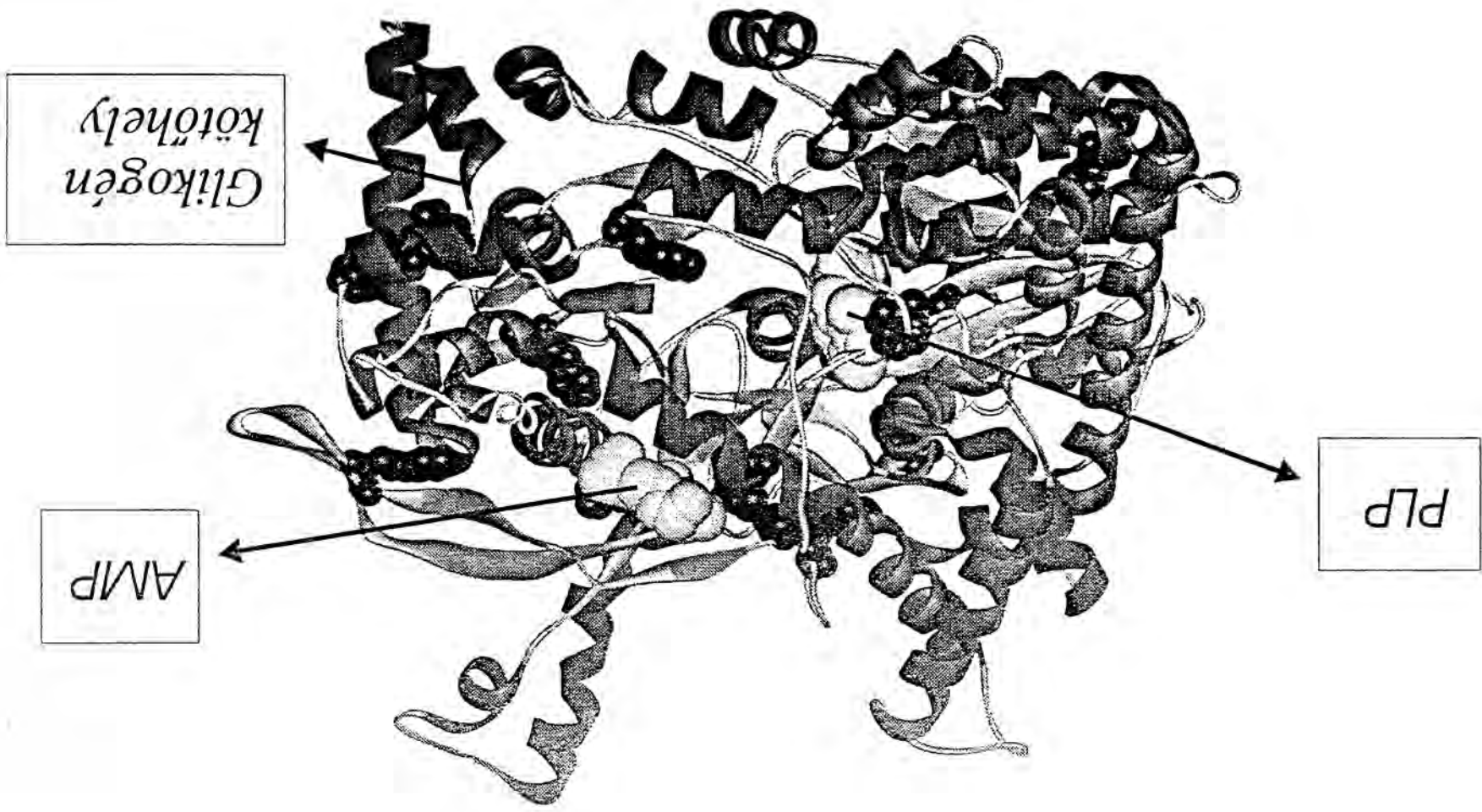
valamint a szubsztrát foszfát csoportja megfelelő mértékig közel kerüljön egymáshoz. A röntgenkristallográfias vizsgálatok viszont kimutatták, hogy a natív enzimben PLP és a G-1-P foszfát csoportjainak P-P távolsága 7,0 Å, valamint ezen csoportok orientációja sem kedvező a közvetlen kölcsönhatás szempontjából (Sygusch és mtsai, 1977; Weber és mtsai, 1978).

A glikogén foszforiláz enzim "in vivo" dimer, "in vitro" körülmények között a foszforiláz *a* tetramer, a *b* forma pedig dimer. A foszforiláz *b* aktiválása foszforilálással, vagy az AMP kötődésével a dimer-tetramer egyensúlyt a tetramer forma irányába tolja el. A tetramer forma aktivitása, valamint a glikogén-kötő képessége nagyon alacsony. A glikogén kötődése a tetramer-dimer átalakulást eredményezi (Johnson és mtsai, 1989).

A glikogén foszforilázról részletes röntgendiffrakciós vizsgálatokból nyert eredmények állnak rendelkezésünkre. Az inaktív („*T-state*”), ill. aktív („*R-state*”) állapotban lévő foszforiláz *b*, ill. *a* enzim kristály-szerkezetét meghatározták (Sprang és mtsai, 1982; Barford és Johnson, 1989; Acharya és mtsai, 1991; Sprang és mtsai, 1991). Ezek a vizsgálatok kimutatták, hogy az enzim szerkezetében hasonló konformációs változások következnek be, amikor inaktív állapotból aktív állapotba kerül a glikogén foszforiláz függetlenül attól, hogy az enzim aktiválása az AMP kötődése, vagy a Ser14 csoport foszforilálása eredményeként következik be. Ezen eredmények szerint az AMP-csoport foszforiláz *b* enzimben a ligand kötőhelyének, és az alegységek kapcsolódási területének harmadlagos szerkezete csak kismértékben változik meg. Ez a kis változás nagy konformációs változásokat eredményez az enzim negyedleges szerkezetében. A foszforiláz inaktív állapotában („*T-state*”) a katalitikus zseb átjárhatóságát az úgynevezett 280-as aminosavakból álló hurok (282-285) megakadályozza, ugyanakkor az enzim aktivált állapotában ez a 280-as hurok elmozdul a csatornából, és egy savas jellegű aminosav (Asp283) helyet cserél a bázikus jellegű Arg569-es aminosavval (Barford és Johnson, 1989). Ez a konformációs változás nemcsak létrehoz egy nagy affinitású foszfát kötőhelyet, hanem egy kedvezőbb elektrostatikus környezetet is kialakít a PLP 5'-foszfát csoportjának (Johnson és mtsai, 1990; Barford és mtsai, 1991).



1. ábra A nyúl vazizomból preparált foszforiláz b monomer szerkezetének szalag-modellje (Johnson és mtsai, 1993). Az AMP (aktivátor) jelöli az alloszterikus kötőhelyet, a PLP pedig a koenzimet, aminek a közelében a katalitikus hely található. Az ábrán ugyancsak felümentük a kísérleteinkben vizsgált 12 db triptofán (fekete gömbök).



### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Enzimek és egyéb anyagok jellemzése

A glikogén foszforiláz *b* enzimet (EC.2.4.1.1) nyúl vázizomból preparáltuk Fischer és Krebs (1962) módszere szerint azzal a változtatással, hogy cisztein helyett  $\beta$ -merkaptóetanolt (MEA) használtunk. A háromszor átkristályosított enzimet kristályszuszpenzióban tároltuk 50 mM-os  $\beta$ -glicerofoszfát pufferben (pH=6.80), ami tartalmazott 10 mM 2-merkaptóetanolt (MEA) és 1.5 mM etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA). Az enzimpreparátumot közvetlenül a felhasználás előtt nukleotid mentesítés, és a kristályosításhoz szükséges kismolekulájú anyagoktól való eltávolítás céljából Sephadex G-25 (15x1 cm) oszlopon gélszűrtük. A maradék nukleotid tartalmat a  $A_{260}/A_{280}$  abszorpció arány alapján ellenőriztük, melynek értéke minden preparátum esetében kisebb volt, mint 0.60. A preparátumok aktivitását Illingworth és Cori (1953) szerint, a glikogén szintézis irányában mértük, 1 mM adenozin-5'-monofoszfát (AMP), 16 mM glükóz-1-foszfát (G-1-P) és 1 % glikogén jelenlétében, 25 °C-on, 50 mM-os  $\beta$ -glicerofoszfát pufferben (pH=6.80). A keletkezett anorganikus foszfátot Taussky és Schorr (1953) szerint fotometrián határoztuk meg. A kísérletek során használt foszforiláz *b* preparátumok specifikus aktivitása 50-58 U/mg volt. A moláris enzimm koncentrációt a 280 nm-en mért abszorpcióból számítottuk, 195 000 dalton mólsúlyt (Titani és mtsai, 1977) és  $A_{280}^{1\text{ cm}}, 1\% = 13.2$  fajlagos abszorpciót (Buc-Caron, Buc, 1975) feltételezve. Az enzim szubsztrájtait és az egyéb ligandokat (AMP, ATP, G-1-P, G-6-P) a SIGMA-tól vásároltuk.

A modellvegyületként használt piridoxamin-5'-foszfátot (PMP) a Serva cégtől szereztük be. A foszforiláz *b* és a piridoxamin-5'-foszfát (PMP) esetében a fluorimetriás méréseket 50 mM-os  $\beta$ -glicerofoszfát pufferben végeztük, amely 10 mM  $\beta$ -merkaptóetanolt (MEA) és 1.5 mM EDTA-t tartalmazott. A fluoreszcencia kioltási kísérletekben használt KI és  $\text{KIO}_3$  SIGMA gyártmányú volt. A  $\text{IO}_3^-$  kioltó alkalmazásakor a puffer nem tartalmazott  $\beta$ -merkaptóetanolt, mert a kialakuló redoxi rendszer zavarta volna a mérést. A jodid kioltó törzsoltdathoz minden esetben adtunk nátrium-tiosulfátot is 0.1 mM koncentrációban, a  $\text{I}_3^-$  képződésének megakadályozására.

A nátrium-tiosulfát oldatot mindig közvetlenül a kísérlet előtt készítettük. Az akrilamid kioltót kétszer átkristályosított formában a SERVA cégtől szereztük be és felhasználás előtt acetontól átkristályosítással tisztítottuk.

Az általunk kifejlesztett módosított "quenching-resolved emission anisotropy" módszer alkalmazhatóságát a következő modellrendszeren vizsgáltuk: fluorofórként PMP-vel jelölt lizozim enzimet (SIGMA), kioltóként akrilamidot használtunk. A lizozim jelölését Churchich leírása (1965) szerint végeztük el. A jelöléshez használt vegyszereket a piridoxál-5'-foszfát kivételével (SERVA) a REANAL-tól szereztük be. A lizozim-PMP jelölési arányt abszorpcióméréssel határoztuk meg (PMP:  $\epsilon$  (1 cm, 325 nm)=8 300 cm<sup>2</sup>/mmol (Churchich, 1965); ill. lizozim:  $\epsilon$  (1 cm, 280 nm)=37 600 cm<sup>2</sup>/mmol (Boyer, 1972), amely a következőknek adódott: PMP:lizozim = 1.3 : 1. A méréseket 50 mM-os foszfát-pufferben (pH=7.0) végeztük. A jelölt lizozim végkoncentrációját úgy állítottuk be, hogy a minták abszorpciója a gerjesztési és az emissziós hullámhosszakon 0.05 alatt legyen (1 cm-es optikai úthossz esetén). A méréseket 20.0 °C-on, 325 ill. 390 nm gerjesztési, ill. emissziós hullámhosszon, 4 ill. 8 nm résszélesség mellett végeztük. Viskozitátsfüggő kísérleteinknél a viszkozitást glicerinnel (SIGMA) növeltük. A különböző tömegszázalékos glicerin-puffer oldatok relatív viszkozitását a CRC Handbook of Physical Chemistry 1984-85-ös kötetének megfelelő táblázatából kerestük ki.

### 3.2 A fluoreszcencia kioltás

A "steady-state" fluoreszcencia kioltási méréseket Hitachi MPF-4, ill. Perkin-Elmer LS50B spektrofluoriméteren végeztük termosztálható küvettaházban, 1x1, ill. 1x0.5 cm-es kvarc küvettaiban. A gerjesztési és emissziós hullámhosszakot, a megfelelő résszélességeket az adott kísérleti rendszerre az 1. táblázat tartalmazza. A fehérjeoldatok abszorpcióját a gerjesztési és emissziós hullámhosszon 0.05 alatt tartottuk a belső szűrő hatás elkerülése céljából.

A fluoreszcencia kioltási kísérleteinknél a fehérje fluoreszcenciát viszonylag tömény törzsoldat kis térfogatú részleteinek fokozatos adagolásával, titrálással oltottuk

ki. Ionerősség korrekcióra nem volt szükség, mivel az alkalmazott ionkoncentráció tartományban az ionerősség növekedésének nincs számottevő hatása a vizsgált fehérjék fluoreszcenciájára.

A mért emissziós intenzitásoknál az enzimminták titrálás közbeni hígulását, valamint az akrilamid kioltó alkalmazása esetében az akrilamid abszorpcióját a gerjesztési hullámhosszon korrekcióba vettük a következő összefüggés alapján:

$$F_{korr} = F_m * H * A_k = F_m \frac{(V_k + V)}{V_k} * 10^{0.5ec} \quad (12)$$

ahol  $F_{korr}$  a korrigált fluoreszcencia intenzitás,  $F_m$  a mért fluoreszcencia intenzitás,  $H$  ill.  $A_k$  a hígulási, ill. abszorpciós korrekciós faktor,  $V_k$  a kiindulási enzimminta térfogata,  $V$  a titrálás közben bekevert térfogatváltozás,  $\epsilon$  a kioltó moláris abszorpciós koefficiense,  $c$  a kioltó aktuális koncentrációja. Mérési adatainkból a Stern-Volmer ill. a módosított Stern-Volmer összefüggés alapján számítottuk a kioltási paramétereket.

a vizsgált fluorofór	hullámhossz		rész	
	gerjesztési [nm]	emissziós [nm]	gerjesztési [nm]	emissziós [nm]
foszforiláz <i>b</i> -ben a triptofán	295	335	4-5	8-9
foszforiláz <i>b</i> -ben kötött PLP	335	525	4-5	8-9
PMP-vel jelölt lizozim	325	390	4-5	8-9
PMP (modellvegyület)	325	390	4-5	8-9

1. táblázat

### 3.3. Fluoreszcencia anizotrópia meghatározása

A "steady-state" fluoreszcencia anizotrópia méréseket ugyancsak a Hitachi MPF-4, ill. Perkin-Elmer LS50B spektrofluoriméteren végeztük. A "steady-state" fluoreszcencia anizotrópia értékeket ( $r$ ) a következő összefüggés alapján számoltuk:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (13)$$

ahol  $I$  a megfelelő polarizátor állásoknál mért fluoreszcencia intenzitás; a VV, HH, HV, és VH indexek a polarizátorok állásait (V: vertikális, H: horizontális) jelöli a gerjesztési és emissziós oldalon.  $G$  az ún. műszerállandó, ami az alkalmazott polárszűrők hatásfokára, a monokromátor rendszerre, a mérési geometriára jellemző hullámhossztól függő állandó:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (14)$$

### 3.4. Fluoreszcencia élettartam meghatározása

A fluoreszcencia élettartam méréseket ISS K2 multifrekvenciás fázis-fluoriméteren (ISS Fluorescence Instrumentation, Champaign, Illinois, USA) végeztük, az ún. "cross-correlation" módszer felhasználásával. Gerjesztő fényforrásként 300 W-os xenon lámpát használtunk, melynek fényét Pockels cella közbeiktatásával moduláltuk. A modulált fény frekvenciatartománya MHz nagyságrendű. Az emisszió fáziskésését és demodulációját mértük. Referenciaként glikogén oldatot alkalmaztunk (0 ns-os élettartam). A minták gerjesztése monokromátoron keresztül történt az 1. táblázatban közölt gerjesztési hullámhosszaknak megfelelően. Az emissziós oldalon a mintáknak megfelelő optikai szűrőket használtunk. A triptofán csoportok fluoreszcencia emisszióját WG335 jelű felülateresztő szűrőn keresztül mértük. A foszforiláz  $b$  enzim koenzimjének (PLP), ill. a piridoxamin-5'-foszfát (PMP) fluoreszcenciáját 535DF35EM, ill. 550FL0725 jelű optikai szűrőkön keresztül detektáltuk. A gerjesztő rés szélessége 4 nm volt. A modulációs frekvencia-tartományt a várható fluoreszcencia élettartamnak megfelelően választottuk ki. Legalább 10 különböző frekvencia értéken mértünk, melyek logaritmikus skálán egyenletesen oszlottak el. A mért fázis és modulációs adatokat az "ISS Decay Analysis Software" segítségével értékeltük ki. Az illesztések jóságának ellenőrzésére a redukált  $\chi^2$  értékét alkalmaztuk.

$$\chi^2 = \frac{\sum \left[ \frac{(P_c - P_m)/\sigma^P}{2n - f - 1} + \frac{(M_c - M_m)/\sigma^M}{2n - f - 1} \right]^2}{2n - f - 1} \quad (15)$$

ahol az összegzést az  $n$  modulációs frekvencia szerint hajtottuk végre. A képletben az  $f$  a szabad paraméterek száma, a  $P$  a fázis eltolódás, az  $M$  pedig a relatív demoduláció értéke. A  $c$  és az  $m$  indexek jelzik a számított és a mért értékeket.  $\sigma^P$  és  $\sigma^M$  az egyes fázis és a moduláció mérések hibája (standard deviáció értéke). A mérés analízise során  $\sigma^P = 0.200$ , és a  $\sigma^M = 0.004$  értékeket alkalmaztunk.

A jósági paraméter alkalmazása során élettartam mérések esetében a különböző függvények feltételezésével kapott illesztéseket hasonlíjuk össze. Általában, ha az egyik ilyen függvény alkalmazásával a  $\chi^2$  értéke jelentősen kisebb, mint a más függvényekkel kapott értékek, akkor az illesztéshez ezt a függvényt használjuk. A fluoreszcencia élettartam adatok esetében az alkalmazható függvényeket két nagy csoportba sorolhatjuk: diszkrét vagy folytonos függvények. A diszkrét függvények alatt gyakorlatilag minden esetben az egy, vagy több exponenciális komponens feltételezését értjük. Ez esetben a jósági paraméter értéke információt ad az optimális komponensszám kiválasztásáról illetően. Azt az analízist fogadjuk el "hitelesnek", ahol a  $\chi^2$  értéke már megfelelő (1-hez közeli), és a komponensek számának növelésével ezen paraméter értéke nem csökken tovább. A folytonos eloszlások közül az élettartam adatok kiértékelése során a leggyakrabban a Gauss, Lorentz, és egyenletes eloszlásokat alkalmazzák. A megfelelő illesztést mindig a jósági paraméter vizsgálatával, valamint a tanulmányozott rendszer jellemző tulajdonságainak ismeretében választjuk ki.

Az átlagos fluoreszcencia élettartamokat ( $\tau$ ) a diszkrét függvény felhasználásával kapott paraméterekkel a következő összefüggés szerint számoltuk (Lakowicz, 1991):

$$\tau = \frac{\sum_i f_i \tau_i^2}{\sum_i f_i \tau_i} \quad (16)$$

ahol  $\tau_i$  a fluoreszcencia élettartam komponenseket, míg  $f_i$  ezen komponensek amplitúdóját jelöli. A fluoreszcencia kioltási állandók értékeit a klasszikus Stern-Volmer egyenlet alapján határoztuk meg (4. egyenlet).

### 3.5. Rezonancia energia transzfer hatásfokának meghatározása

A Förster-típusú rezonancia energia transzfer (FRET) megfelelően alkalmas fluorofór párok között jöhet létre. A dipól-dipól kölcsönhatás során az egyik fluorofór (donor molekula) gerjesztett állapotában energiát ad át (foton emissziója nélkül) a másiknak (akceptor molekula). Az energia-átmenet ún. szingulett állapotok között jön létre. A folyamat során hő nem keletkezik, és nem jön létre ütközéses kölcsönhatás a két molekula között.

A transzfer kialakulásának feltétele, hogy 1.) a donor molekula emissziós spektruma, valamint az akceptor molekula abszorpciós spektruma átfedésben legyen; 2.) a donor kvantumhatásfoka megfelelően nagy legyen; 3.) a donor emissziós vektora az akceptor molekula abszorpciós vektorával kedvező szöveget zárjon be; 4.) a donor és akceptor molekulák távolsága az 1-10 nm tartományba essen. A Förster típusú rezonancia energia transzfer a donor-akceptor távolság hatodik hatvány szerinti változása miatt (ld. 18. egyenletet) igen jó térbeli felbontást biztosít, s mint spektroszkópiás mérőszalag alkalmazható inter-, ill. intramolekuláris távolságok meghatározására.

A FRET kvantumhatásfoka (E) a következő módon írható fel:

$$E = \frac{k_t}{k_f + k_o + k_t} \quad (17)$$

ahol  $k_t$  az energia transzfer, a  $k_f$  a donor emisszió útján történő legerjesztődésének reakciósebességi állandója, a  $k_o$  pedig a donor molekula különböző sugárzásmentes legerjesztődésének összegzett reakciósebességi állandója.

A FRET reakciósebességi állandója ( $k_t$ ) a következő egyenlettel fejezhető ki (Förster, 1948; 1959):

$$k_t = cJn^{-4}k_fR^{-6}\kappa^2 \quad (18)$$

ahol  $J$  a donor emissziós, ill. az akceptor abszorpciós spektrumának átfedési integrálja,  $n$  a közeg törésmutatója,  $R$  a donor és akceptor molekula aktuális távolsága,  $\kappa^2$  a donor és akceptor molekulák relatív helyzetét jellemző orientációs faktor. Az átfedési integrált ( $J$ ) a következő egyenlet szerint határozhatjuk meg:

$$J = \left( \int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int F_D(\lambda) d\lambda \right) M^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4 \quad (19)$$

ahol  $F_D(\lambda)$  a donor fluoreszcencia emissziós spektruma és  $\varepsilon_A(\lambda)$  az akceptor abszorpció spektruma. Mivel a  $J$  és az  $n$  függetlenek a donor-akceptor távolság változásától, a 18. egyenletről származtatható egy újabb FRET paraméter, az  $f$  (Somogyi és mtsai, 1984):

$$f = \frac{k_t}{k_f} = CR^{-6} k^{-2} \quad (20)$$

ahol a  $C$  állandó tartalmazza a közeg törésmutatóját ( $n$ ) és az átfedési integrált ( $J$ ).

Tekintve, hogy a  $k_t$  és  $k_f$  direkt mérése nehézségekbe ütközik, az energiatranszfer hatásfoka ( $E$ ), valamint az akceptor jelenlétében meghatározható donor kvantumhatásfoka ( $\Phi_{DA}$ ), segítségével egy esetenként kényelmesebben meghatározható  $f$  paraméter írható fel:

$$f = E / \Phi_{DA} \quad (21)$$

ahol

$$\Phi_{DA} = \frac{k_f}{k_f + k_o + k_t} \quad (22)$$

Egy reális fehérjepopuláció esetén azonban a donor és az akceptor relatív távolságának fluktuációja miatt a donor és az akceptor molekula relatív távolsága, és orientációja időről időre változik, a mérések során nem az  $E$ , ill.  $\Phi_{DA}$ , hanem azok átlagolt értékei határozhatók meg.

$$f = \frac{\langle E \rangle}{\langle \Phi_{DAi} \rangle} = \frac{\left\langle \frac{k_{ti}}{k_f + k_{ti} + k_{oi}} \right\rangle}{\left\langle \frac{k_f}{k_f + k_{ti} + k_{oi}} \right\rangle} \quad (23)$$

$k_f$  értékét állandónak feltételezve, az  $f$  paraméterre felírható a (23) egyenlet alábbi átalakított formája:

$$f = \left\langle \frac{k_{ti} \tau_i}{k_f \langle \tau_i \rangle} \right\rangle \quad (24)$$

ahol  $\tau_i$  az  $i$ -edik donor szinglett élettartama akceptor jelenlétében.

Az  $f$  paraméterre a következő összefüggés írható fel:

$$f = C \langle \alpha_i R_i^{-6} k_i^{-2} \rangle \quad (25)$$



ahol

$$\alpha_i = \frac{\tau_i}{\langle \tau_i \rangle}$$

(26)

Későbbiekben a korábban egy donor-egy akceptor rendszerre leírt módszert kiterjesztettük komplex donor - akceptor rendszerekre (egy donor - több akceptor, több donor - egy akceptor, valamint több donor - több akceptoros rendszerekre) (Somogyi és mtsai, 1998). Szokásos gerjesztési körülmények között minden  $n$  donor - 1 akceptor rendszer  $n$  különböző 1 donor - 1 akceptor rendszer populációjaként fogható fel, valamint az 1 donor -  $n$  akceptor rendszerben lezajlott transzfer - folyamatok  $n$  db független transzferfolyamat összegeként kezelhetők. Ennek megfelelően a (21)-es összefüggés tetszőleges transzferrendszerre alkalmazható forma. A (25)-ös összefüggésnek megfelelően az  $f$  változása - állandó  $\alpha_i$  értékek esetén - az  $\langle R_i^6 \kappa_i^2 \rangle$  változását jelenti, amit vagy konformációváltozás, vagy a fluktuációk amplitúdójának ( $R_i$ ), térbeli elrendeződésének ( $\kappa_i$ ) változása idézhet elő. Az  $f$  paraméter sokkal érzékenyebb az  $R$  változására, mint a relatív orientáció megváltozására, a kitevők viszonyából következően. Így általában az  $f$  változását az  $R$  változása szabja meg. Egy megfelelő donor-akceptor festékpárt tartalmazó enzimfehérje esetén a hőmérséklet fokozatos emelésével az intramolekuláris fluktuációk amplitúdói nőnek, ami az  $f$  értékének növekedését eredményezi. Az energia transzfer hatásfokának a donor kvantumhatásfokával normált értéke meredekebben emelkedik a hőmérséklet függvényében, ha a donor akceptor közötti fehérjemátrix flexibilisebb. Ha tehát a mérés folyamán nincs konformáció változás, az  $f$  paraméter információt ad a donor és akceptor molekula közötti fehérjemátrix dinamikáját illetően, ill. a környezeti paraméterek megváltozásának, vagy a ligandok kötődésének hatására a makromolekulákban bekövetkező flexibilitás megváltozásáról.

A fent ismertetett módszert alkalmaztuk a foszforiláz  $b$  enzim ligandjai kötődésének hatására bekövetkező dinamikai, konformációs változások követésére. A dimer foszforiláz  $b$  enzim több donor - több akceptoros rendszernek tekinthető, mivel alegységenként 12 triptofánnal, és egy a triptofánnal donor - akceptor párt képező pindoxál-5'-foszfát (PLP) csoporttal rendelkezik.

Méréseinknél  $f$  érték helyett egy azzal arányos  $f'$  értéket határoztunk meg oly módon, hogy a donor kvantumhatásfoka helyett az azzal arányos fluoreszcencia intenzitást mértük.

$$f' = E / F_{DA} \quad (27)$$

ahol  $F_{DA}$  a donor fluoreszcencia intenzitása az akceptor jelenlétében. Az  $f$  és  $f'$  paraméterek értéke egymással egyenesen arányosak. Az energiatranszfer hatásfokát ( $E$ ) az akceptor fluoreszcenciájának növekedésén mértük (Brand és Witholt, 1967):

$$E = F_{AD} / F_{AA} \quad (28)$$

$F_{AD}$ , ill.  $F_{AA}$  az akceptor fluoreszcencia intenzitása donor, ill. az akceptor gerjesztési hullámhosszán gerjesztve.

Az  $f'$  paraméter hőmérsékletfüggését tanulmányoztuk a foszforiláz  $b$  enzimen, ill. alloszterikus ligandjainak jelenlétében (1 mM AMP, 32 mM G-1-P, 10 mM ATP) 20-50 °C hőmérséklet tartományban. A fluoreszcencia intenzitás méréseket Perkin-Elmer LS50B spektrofluoriméteren végeztük el. A Trp (donor) csoportokat 295 nm-es, a PLP (akceptor) koenzimet 335 nm-es fényvel gerjesztettük. A donor, ill. akceptor fluoreszcencia emisszióját 340, ill. 525 nm-en detektáltuk.

### 3.6. Foszforeszcencia élettartam meghatározása

A foszforiláz  $b$  enzimen található triptofán (Trp) csoportok foszforeszcencia élettartamának mérését Prof. Giovanni Strambini laboratóriumában Olaszországban végeztük (Istituto di Biofisica, Pisa), Strambini és munkatársai által összeállított foszforeszcencia élettartam mérő készüléken (Strambini, 1983).

Fényforrásként 295 nm-re hangolt festéklézert (UV 500 M-Candella) használtunk, melyet egy impulzus üzemmódban működő lézer frekvencia-duplázott fényével pumpáltunk. Az impulzusok átlagos időtartama 1  $\mu$ s, az energiatarvalma tipikusan 1-10 mJ között volt.

A triptofán csoportok foszforeszcencia intenzitásának lecsengéseit 430 nm-en detektáltuk a gerjesztést követően 1 ms után, egy elektronikusan vezérelt fényzár segítségével. A lecsengési jel digitalizálása egy Apploscope rendszerrel (HR-4; RC

Electronics) történt. A digitalizált jeleket egy Apple II számítógép átlagolta. A lecsengési görbék analízisét a nemlineáris legkisebb négyzetek módszerén alapuló "Global Analysis" (Global Unlimited, LFD University of Illinois, Urbana) programmal végeztük el. A foszforeszcencia élettartamokat 20.0 °C-on mértük. Az enzim oldatot mérés előtt egy éjszakán át 4 °C-on, 50 mM-os  $\beta$ -glicerofoszfát pufferrel (pH=6.80) szemben dializáltuk, hogy eltávolítsuk a  $\beta$ -merkaptoetanolt a mintából.

Ahhoz, hogy reprodukálható adatokat kapjunk, elengedhetetlen volt a mintában oldott oxigén eltávolítása. Az oldott oxigént Strambini és munkatársai által leírt módszer (Strambini, 1987) szerint távolítottuk el. A vizsgálandó minta kb.: 0.5 ml-ét egy L-alakú kvarc küvettaba jutattuk, majd egy légmentesen záró dugóval lezártuk. A küvetta rövidebb végét egy gázkicserélő rendszerhez csatlakoztattuk. Először enyhe vákuummal megszívattuk a mintát, majd nagy-tisztaságú nitrogént ( $O_2$  tartalom 0.1 ppm alatt volt) áramoltattunk a küvetta. A vákuumot, és a nitrogén beáramoltatást felváltva 10-15 percen keresztül alkalmaztuk.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

### 4.1. A dinamikus és sztatikus fluoreszcencia kioltási állandók szétválasztására alkalmas "steady - state" módszer

A fluoreszcencia kioltásban az egyik kulcsszeretet a bimolekuláris sebességi állandó ( $k_+$ ) játszsa, ami a fluorofór és a kioltó relatív transportját (diffúzióját) jellemzi. A fehérjék saját fluoreszcenciájának tanulmányozásánál a  $k_+$  értéke különböző típusú információt hordoz aszerint, hogy pl. a fehérje egy felületi csoportja által emittált fluoreszcencia kioltását vizsgáljuk, vagy az emitter a fehérjemátrix belsejébe temetett. Az előző esetben a  $k_+$  a fehérje felszín dinamikájáról, s a környezet fiziko-kémiai paramétereiről hordoz információt (Somogyi és mtsai, 1992), míg az utóbbi esetben értékét a fehérje intramolekuláris fluktuációi, s az emitter közvetlen környezetének strukturális tulajdonságai szabják meg (Somogyi és mtsai, 1993). A  $k_+$  értékének vagy relatív változásának meghatározása mindkét esetben értékes információt nyújthat a fehérjék strukturáját és lokális (vagy többé - kevésbé lokális) dinamikáját illetően.

A (10) és (11) egyenletek tanúsága szerint általános esetben a dinamikus kioltási állandó ( $K_{sv}$ ) - és így a  $k_+$  - értéke nem határozható meg "steady-state" fluoreszcencia kioltási mérések segítségével (csak a dinamikus ( $K_{sv}$ ) és sztatikus ( $V$ ) összege). A két kioltási állandó szétválasztásának egyik módja, hogy a fluoreszcencia élettartamot a kioltó különböző koncentrációja mellett meghatározzuk, és a (4) egyenlet felhasználásával megkapjuk a  $K_{sv}$  értékét. Ezután ha  $V$  értékét is meg kívánjuk határozni, a  $K_{sv}$  és  $V$  összegéből (amit a "steady-state" fluoreszcencia intenzitás méréssel határozhatunk meg) levonva a  $K_{sv}$  értékét megkapjuk a sztatikus kioltási állandót.

Annak érdekében, hogy az idő- és költségigényes élettartam méréseket elkerüljük, kifejlesztettünk egy új "steady-state" módszert a dinamikus kioltási állandó szelektív meghatározására (Lakos és mtsai, 1995). Módszerünk az ún. "Quenching Resolved Emission Anisotropy" eljárás (QREA; Eftink, 1983) továbbfejlesztett változata, ami "steady-state" emissziós anizotrópia különböző koncentrációjú kioltó jelenlétében történő meghatározásán alapszik.

Ha a fluorofór gerjesztése polarizált fényel történik, az emittált fény is polarizált lesz, és a fluoreszcencia anizotrópia ( $r$ ) a Perrin-egyenlet szerint függ a fluorofór aktuális élettartamától ( $\tau$ ) (Perrin, 1936):

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left[ 1 + \frac{kT\tau}{\eta V_h} \right] \quad (29)$$

$r_0$  a határanizotrópia,  $\tau$  a gerjesztett állapot fluoreszcencia élettartama,  $\eta$  a közeg mikroviszkozitása,  $V_h$  a fluoreszkáló részecske molférgata a hidrátburokkal együtt,  $k$  a Boltzmann-állandó,  $T$  az abszolút hőmérséklet. A "steady-state" emissziós anizotrópiát ( $r$ ) a (13) egyenlet alapján határozhatjuk meg.

A (29) egyenletből látható, hogy az  $1/r$  lineárisan változik a fluorofór fluoreszcencia élettartamával. Ily módon összefüggésben van a dinamikus kioltással, és érzéketlen a sztatikus kioltási folyamatra. Mivel az emissziós anizotrópia csak a dinamikus kioltási folyamatról tudósít, ezért  $K_{sv}$  meghatározására alkalmas paraméternek tűnik.

Meg kell azonban jegyeznünk, hogy azokban az esetekben, amikor a fluorofór rotációs mozgása két (vagy több) független rotációs mozgásra bontható, a (29) egyenlet jobb oldala bonyolultabb. Számítógépes szimuláció segítségével azonban bemutatható, hogy az  $1/r$  és  $\tau$  közötti lineáris összefüggés a fluorofór rotációját leíró paraméterek igen széles tartománya esetén is fennáll (Eftink, 1983).

A következőkben a módszer leírását arra az esetre adjuk meg, amikor az emittált fluoreszcencia teljes egésze kioltható ( $\alpha = 1$ ). Amikor az  $\alpha$  1-nél kisebb, az alábbiakban bemutatott eljárás nem alkalmazható.

A (4) egyenletet beírva a (29) egyenletbe:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left[ 1 + \frac{kT}{\eta V} \frac{\tau_0}{1 + K_{sv} [Q]} \right] \quad (30)$$

ahol  $\tau_0$  a fluorofór kioltó távollétében mért fluoreszcencia élettartama.

A továbbiakban az  $r_i$  és  $[Q_i]$  jelöléseket használjuk az  $r$  és  $[Q]$  mennyiségek referencia értékeként. A  $\Delta(1/r) = 1/r_i - 1/r$  kifejezést a következőképpen írhatjuk fel:

$$\Delta \frac{1}{r} = \frac{1}{r} - \frac{1}{r} = \frac{kT\tau_o}{r_o V_h \eta} \left[ \frac{1}{1 + K_{sv} [Q_r]} - \frac{1}{1 + K_{sv} [Q]} \right] \quad (31)$$

Az alábbi rövidítéseket bevezetve:

$$A = \frac{kT\tau_o}{r_o V_h \eta} \quad \text{és} \quad \Delta[Q] = [Q] - [Q_r] \quad (32)$$

a (31) egyenletre a következő összefüggést kapjuk:

$$\Delta \frac{1}{r} = A \frac{K_{sv} \Delta[Q]}{(1 + K_{sv} [Q_r])^2 + K_{sv} \Delta[Q] (1 + K_{sv} [Q_r])} \quad (33)$$

Mindkét oldal reciprokát véve:

$$\left[ \Delta \frac{1}{r} \right]^{-1} = \frac{1 + K_{sv} [Q_r]}{A} + \frac{(1 + K_{sv} [Q_r])^2}{AK_{sv}} \frac{1}{\Delta[Q]} \quad (34)$$

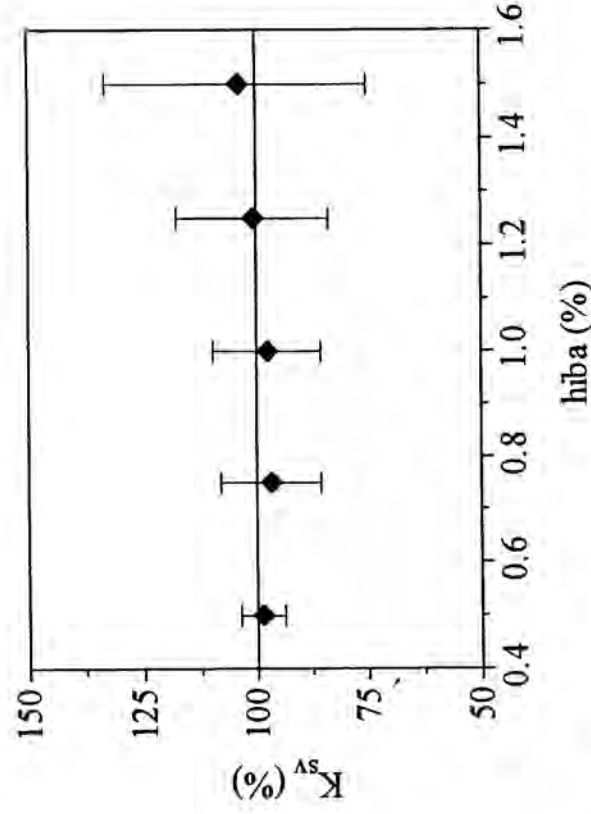
a  $(\Delta 1/r)^{-1}$  és  $(1/\Delta Q)$  között lineáris összefüggést kapunk. Ha képezzük ezen egyenes meredekségének (s) és tengelymetszetének (i) hányadosát, a következő egyenletet kapjuk:

$$\frac{s}{i} = \frac{1}{K_{sv}} + [Q_r] \quad (35)$$

A (35) egyenlet felhasználható a dinamikus kioltási állandó, a  $K_{sv}$  értékének meghatározására, mivel  $Q_r$  ismert (természetesen  $Q_r$  tetszőleges).

A (34), és a (35) egyenletek alkalmazása a mért anizotrópia értékek további transzformációját feltételezi, ami a meghatározandó  $K_{sv}$  érték további hibáját növeli. Ez a tény azzal együtt, hogy az emissziós anizotrópia meghatározásához - ellentétben a klasszikus kioltási kísérletekkel - négy (de legalább kettő) intenzitás adat szükséges ((13) egyenlet), fontossá teszi annak megvizsgálását, hogy a mérési hibák halmozódása milyen mértékű hibát eredményez a  $K_{sv}$  értékénél. A módszer pontosságát számítógépes szimulációval ellenőriztük. A dinamikus kioltási állandó értékére ( $K_{sv}$ )  $6 M^{-1}$  és a határanizotrópia ( $r_o$ ) értékül 0.4-et választottunk. A  $K_{sv}$  számított átlagértékei és a hozzátartozó hibák 15 független számítógépes szimulációból származnak, ahol a kioltó koncentrációja és a fluoreszcencia intenzitás értékei a számítógép véletlen-generátora által bevezetett hibát tartalmazzák (2. és 3. ábra). Az 2. ábrán  $K_{sv}$  meghatározásának a

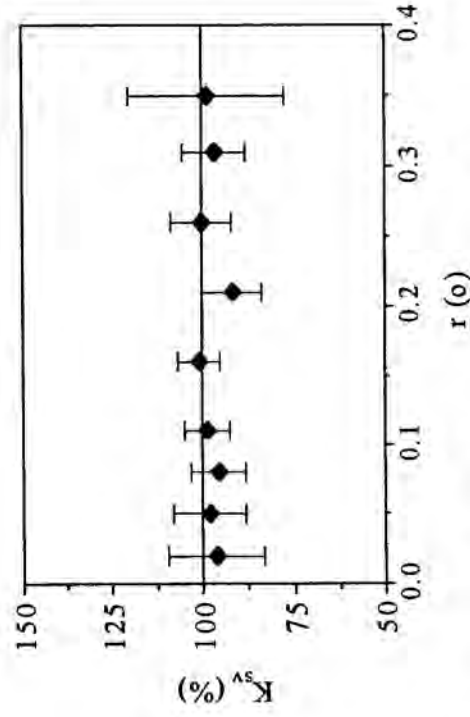
hibája látható pipettázási, illetve a fluoreszcencia intenzitás leolvasási hibájának függvényében.



2. ábra  $K_{sv}$  szimulált átlagértékei és a hozzájuk tartozó hiba a pipettázási és a fluoreszcencia intenzitás leolvasási hibájának függvényében. A zérus kioltó koncentrációhoz tartozó anizotrópia érték  $0.25$ ,  $100\% = 6 M^{-1}$ .

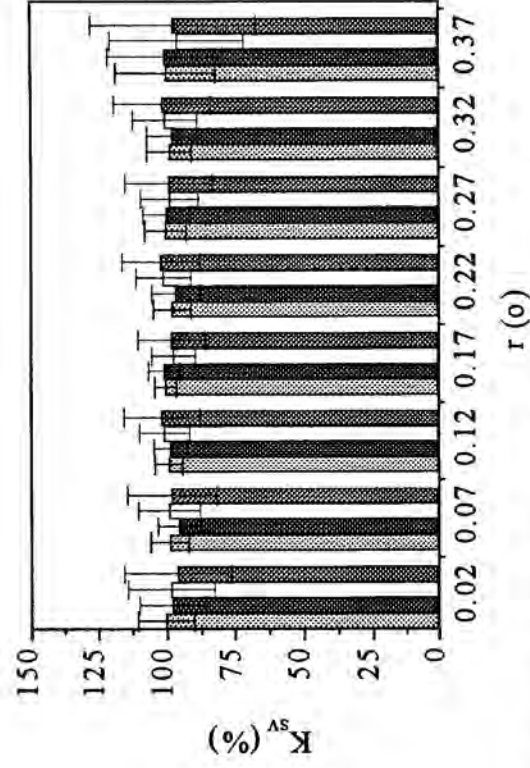
A 3. ábrából kitűnik, hogy a  $K_{sv}$  meghatározásának hibája, a kiindulási anizotrópia-tartományt tekintve közepes anizotrópia értékeknél ( $0.05 - 0.3$ ) relatíve alacsony, csak a szélső értékeknél nő számottevően. Ez érthető, ha meggondoljuk, hogy 0-hoz közel eső anizotrópia értékeket nagy bizonytalansággal lehet meghatározni, valamint ha a kiindulási anizotrópia közel van az elméleti határértékhez ( $0.4$ ), akkor a kioltás következtében értéke alig fog változni, következésképpen az anizotrópia különbségek nagy hibával határozhatók meg.

Az 2. és 3. ábrán bemutatott számítógépes szimulációk tanúsága szerint az általunk kifejlesztett módszer hibája összemérhető a klasszikus "steady-state" fluoreszcencia kioltási kísérletekből származó kioltási paraméterek hibájával, ami a módszer alkalmazhatóságát bizonyítja. A hiba mértéke természetesen függvénye a tanulmányozott kísérletes rendszer fluoreszcencia paramétereinek.



3. ábra  $K_{sv}$  szimulált átlagértékei és a hozzájuk tartozó hiba a kioltó jelenléte nélkül mért anizotrópia függvényében. (A határanizotrópia,  $r_o=0.4$ ; a pipettázási és a fluoreszcencia intenzitás leolvasásának hibája 1%, 100%=6  $M^{-1}$ )

A (33) egyenletből az is látható, hogy az adott fluorofór-kioltó rendszer esetén a mérés által átfogott anizotrópia tartomány ( $\Delta(1/r)$ ) annál nagyobb, minél nagyobb a  $K_{sv}$  és  $\Delta Q$  szorzat értéke (ha  $[Q_i]=0$ , akkor  $[\Delta Q]=Q_{max}$ ). Mivel a fluoreszcencia kioltási kísérleteknél  $K_{sv}$  és  $Q_{max}$  értéke is jól meghatározott véges intervallumba esik, ezért megvizsgáltuk a dinamikus kioltási állandó átlagának és a meghatározás hibájának alakulását a rendszer kiindulási anizotrópiájának függvényében (4. ábra), különböző, hasonló jellegű méréseknél előforduló  $K_{sv}$  és  $Q_{max}$  szorzatértékekre (10 - 0.1).



4. ábra A dinamikus kioltási állandó meghatározásának hibája a kiindulási anizotrópia függvényében, különböző  $K_{sv}$  [ $Q_{max}$ ] értékekre (100% = 6  $M^{-1}$ ;  $K_{sv}$  [ $Q_{max}$ ] értékek sorrendben az egyes oszlopokra: 10, 3, 1, 0.1).

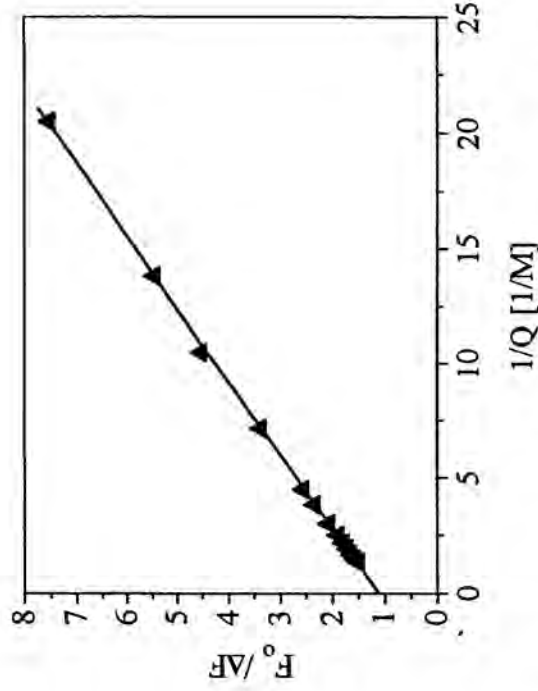


A 4. ábrából látható, hogy  $K_{SV}$  meghatározásának hibájában inkább dominál az, hogy a fluorofór emissziós anizotrópiájának kiindulási értéke 0-hoz vagy az elméleti határanizotrópiához van közel, mintsem a  $K_{SV}[\Delta Q_{max}]$  szorzat értéke.

A módszer alkalmazhatóságát összefoglalva tehát megállapítható, hogy - korlátai (homogén emitter populáció ( $\alpha=1$ , monoexponenciális lebomlás)) ellenére - alkalmazható a dinamikus kioltási állandó meghatározására "steady-state" mérési körülmények között. Olyan esetekben, amikor a fluorofór multiexponenciális fluoreszcencia lebomlással rendelkezik, a módszer csak a finom részletek feloldása nélkül ad információt. A módszer természetéből fakadóan biztonsággal csak akkor használható, ha a zérus kioltó koncentrációhoz tartozó anizotrópia érték elegendően magas, a határanizotrópia értéktől viszont elegendően távol van. Ha a zérus kioltó koncentrációhoz tartozó anizotrópia alacsony, akkor a  $[Q]$  és  $r$  referencia értékeként (lásd (31) egyenletet) a legnagyobb kioltó koncentrációt, és az ehhez tartozó anizotrópia értéket kell választani, mert ez esetben a legnagyobb az anizotrópia értéke. Ha az anizotrópia kiindulási értéke közel van a határanizotrópiához ( $\tau_0$ ), akkor a mérés által átfogott anizotrópia-tartomány meglehetősen szűk, ami a hiba nagymértékű növekedéséhez vezethet.

A módszer további tesztelését szolgálhatja egy, az oldószer molekulák számára teljesen hozzáférhető fluorofór vízdoldékony kioltó segítségével történő vizsgálata különböző viszkozitású környezetben. Erre az ad módot, hogy ilyen esetekben a bimolekuláris kioltási állandó, a  $k_+$  diffúzió-limitált, tehát a mért dinamikus kioltási állandó ( $K_{SV}$ ) a közeg viszkozitásával fordítottan arányos (legalábbis egy viszonylag széles viszkozitás-tartományban) (Eftink és Ghiron, 1976). Ezért piridoxamin-5'-foszfáttal (PMP-vel) jelölt lizozim enzimet, és akrilamidot használva meghatároztuk az akrilamid fluoreszcencia kioltási állandóit az előbb részletezett módszer segítségével, különböző összetételű glicerin-puffer közegben 20.0 °C-on. A kapott eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

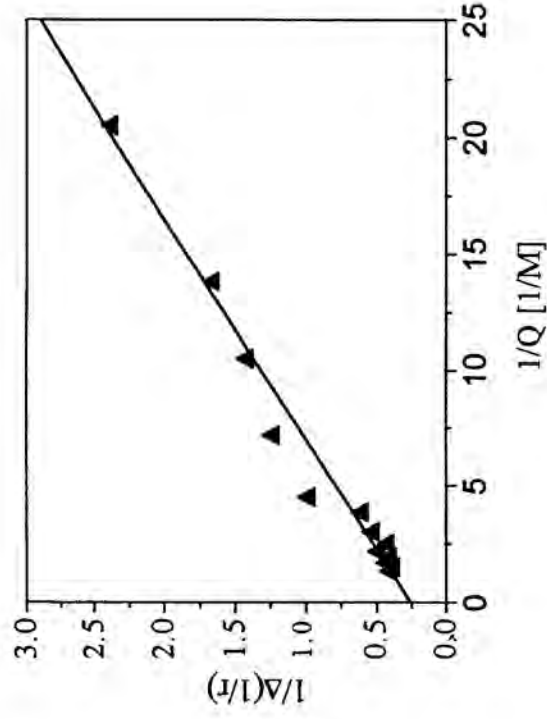
Az 5. ábrán a PMP-vel jelölt lizozim enzim akrilammiddal történő fluoreszcencia kioltásának módosított Stern-Volmer ábrája látható.



5. ábra A PMP-vel jelölt lizozim fluoreszcenciájának kioltása akrilamiddal (módosított Stern-Volmer ábrázolás), glicerin koncentráció: 0 %;  $t=20.0$  °C;  $\lambda_{ex}=325$  nm;  $\lambda_{em}=390$  nm.

Az a tény, hogy a módosított Stern-Volmer ábrázolásban az illesztett egyenes tengelymetszetének értéke  $\sim 1.0$ , azt bizonyítja, hogy az akrilamid számára a PMP által emittált fluoreszcencia teljes egészé kioltható. Az egyenes meredekségéből a dinamikus ( $K_{sv}$ ), és a sztatikus ( $V$ ) kioltási állandók összegére  $4.0 \text{ M}^{-1}$  értéket kaptunk.

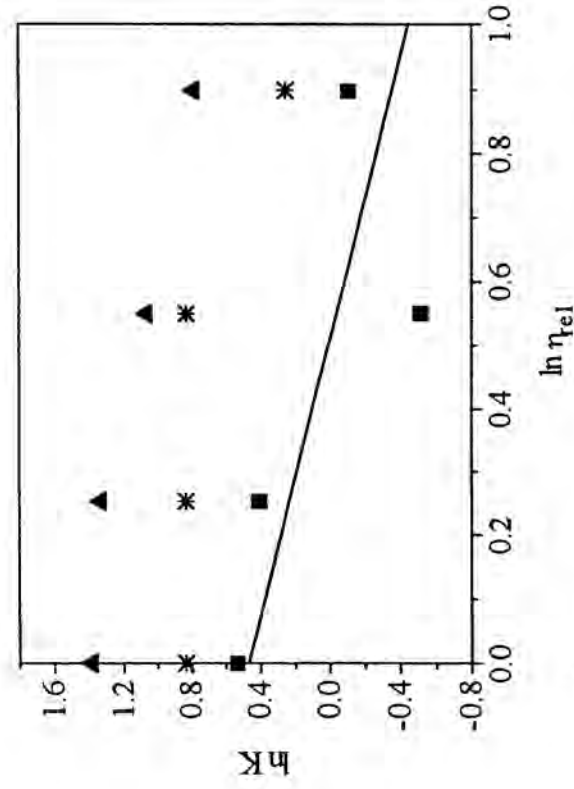
A dinamikus kioltási állandót a (34), ill. (35) egyenlet szerint az 6. ábrán látható egyenes meredekségéből határoztuk meg ( $K_{sv} = 1.7 \text{ M}^{-1}$ ). A két módszerrel meghatározott kioltási állandók különbsége pedig megadja a sztatikus kioltási állandó értékét ( $V = 2.3 \text{ M}^{-1}$ ).



6. ábra A QREA módszer alkalmazása a PMP-vel jelölt lizozim fluorezcenciájának akrilamiddal történő kioltására, glicerin koncentráció: 0 %,  $t=20.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}=325\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=395\text{ nm}$ .

glicerin koncentráció (m/m %)	relatív viszkozitás	$K_{\text{sv}}+V$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$K_{\text{sv}}$ ( $\text{M}^{-1}$ )	V ( $\text{M}^{-1}$ )
0	1.000	4.0	1.7	2.3
10	1.288	3.8	1.5	2.3
20	1.734	2.9	0.6	2.3
30	2.453	2.2	0.9	1.3

2. táblázat A lizozim enzimhez kötött PMP fluorezcenciájának akrilamiddal történő kioltásának dinamikus ( $K_{\text{sv}}$ ) és sztatikus ( $V$ ) kioltási állandói különböző glicerin koncentrációk mellett.



7. ábra A kioltási állandók természetes logaritmusának relatív viszkozitás természetes logaritmusának függvényében a PMP-vel jelölt lizozim enzim-akrilamid rendszerre vonatkozóan. (Az egyenes meredeksége:  $-0.93$ ). ▲,  $\ln(K_{SV} + V)$ ; ■,  $K_{SV}$ ; \*,  $\ln V$ .

Amint az várható volt, a dinamikus kioltási állandó ( $K_{SV}$ ) fordítottan arányos a közeg viszkozitásával. A 7. ábrán a dinamikus kioltási állandók természetes logaritmusának értékeire illesztett egyenes meredekségére  $-0.93$  értéket kaptunk. Ugyanakkor a sztatikus kioltási állandó ( $V$ ) a viszkozitástól függetlennek bizonyult (7. ábra). A fenti kísérlettel módszerünk alkalmazhatóságát kívántuk tesztelni, és azt vártuk, hogy az elméleti megfontolásoknak megfelelően a  $K_{SV}$  értéke a viszkozitással fordított arányban változik, míg a  $V$  értéke állandó marad (lásd a 7. ábrát, eltekintve a 30 % glicerin mellett meghatározott kiugró sztatikus kioltási állandó értékétől, ami feltehetően mérési hiba következménye). Ez hibahatáron belül valóban teljesül. Az eddigi hallgatóságos feltételezést, miszerint a  $K_{SV}$  és  $k_i$  értéke párhuzamosan változik, vagyis a fluorofór kioltó távollétében mért élettartama nem változik a glicerin koncentráció változásával, kísérletesen ellenőriztük. Azt találtuk, hogy kioltó nélkül a rendszer fluoreszcencia intenzitása az egész viszkozitási tartományban 5 %-on belül állandó marad.

## 4.2. Allosztérikus ligandok hatása a foszforiláz *b* enzim intramolekuláris dinamikájára

A fehérjék működésénél első lépés a ligandok, vagy ligandumok (általában kis molekulák, esetenként más fehérjék) fehérjéhez történő kötődése. Enzimefehérjék esetében ezen ligandumok a szubsztrát, aktivátor, inhibitor, kofaktor stb.

Egyre több kísérleti és elméleti adat szól amellett, hogy az enzim-ligand komplex kialakulásának leírása, miszerint a ligand a fehérjemolekula szerkezete által megszabott jól definiált geometriájú térrészben, a külső folyadéktér paraméterei (s esetleg a fehérje elektromos tere) által meghatározott módon szabad diffúziós mozgással veszi fel a kötődéshez szükséges pozíciót (konformációt), nem felel meg a valóságnak:

a) Bizonyos esetekben a fehérje kötőcentrum körüli feszími dinamikája meghatározó módon befolyásolhatja a kötődést ("gated binding") (McCammon és Northrup, 1981; Szabo és mtsai, 1982).

b) Fehérje-dinamikai szimulációk tanúsága szerint a ligandumok diffúziós karaktere a fehérjefelszín közelében a kötőcentrum körüli fehérje-víz kölcsönhatás perturbációja miatt lényegesen megváltozik (Allison és mtsai, 1990).

c) A lokális, mikroszkópikus asszociációs-disszociációs folyamatok, amelyek a fehérje és a ligand között mennek végbe a lokális viszkozitás által befolyásolt módon, a komplex kinetikai élettartamát jelentős mértékben módosíthatják (Somogyi és mtsai, 1978; Welch és mtsai, 1983).

Azon túlmenően, hogy a fehérjedinamika lényeges szerepet játszhat a szubsztrát kötődését közvetlenül megelőző mozgásának kialakításában, a fehérje kötőcentrumának lokális dinamikája meghatározó szerepet tölt be a katalízis reakciókoordinátájának egész tartományában (Careri és mtsai, 1979; Welch és mtsai, 1982; Damjanovich és mtsai, 1983; Somogyi és mtsai, 1984).

A fentieknek megfelelően, a kötőcentrum lokális dinamikája meghatározó lehet mind a molekuláris felismerési, mind a katalízis további lépéseiben. Kísérletes és elméleti vizsgálatainkban ezen lokális dinamika szerepét illetően kívántunk információkat gyűjteni. Meg kívántuk vizsgálni, hogy a foszforiláz *b* enzim ligandjainak kötődése,

befolyásolja-e a ligand kötőhely, ill. az enzim egészének konformációját, dinamikai tulajdonságait.

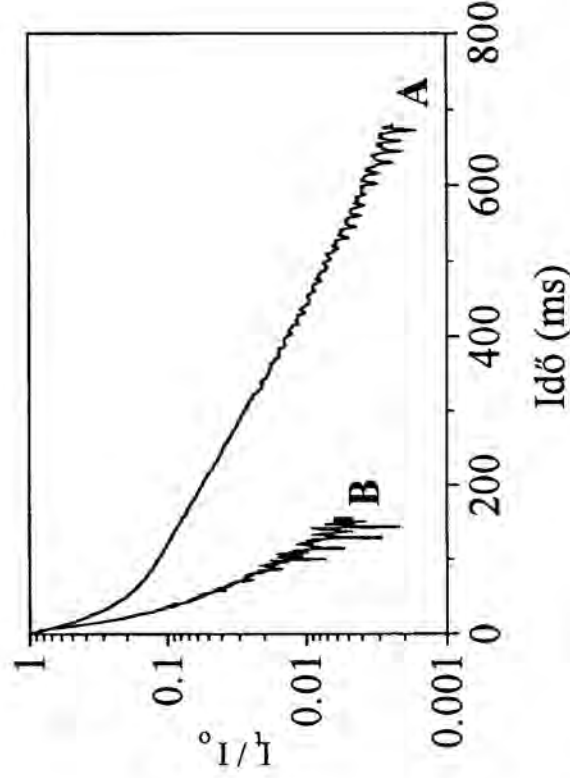
A foszforiláz *b* enzimben a ligandok kötődésének hatására bekövetkező konformációs változást több kutatócsoport is vizsgálta különböző mérési technikák alkalmazásával. Honikal és Madsen (1973) a foszforiláz *b* enzim koenzimje által emittált fluoreszcencia kioltását vizsgálta jodid kioltóval. Megfigyelésük szerint a PLP oldószer számára való hozzáférhetőségét a különböző ligandok jelenléte megváltoztatja. Allosztérikus inhibitorok (ATP, G-6-P) jelenléte növeli, az aktivátor (AMP) és/vagy a szubsztrát (G-1-P) jelenléte pedig csökkenti a PLP hozzáférhetőségét. Egy oxfordi kutatócsoport különböző módszereket (ESR, NMR, -SH csoportok reaktivitásának vizsgálata, fluoreszcencia spektroszkópia) alkalmazva vizsgálta a foszforiláz *b* enzimben a ligandok kötődésének hatására bekövetkező konformációs változásokat (Busby és Rada 1976; Griffiths és mtsai, 1976). A enzim egyik reaktív -SH csoportjához kovalensen kötött ESR jelölő (4-(2-jódacetamid)2,6,6-tetrametil piperidinoxil) mobilitását mérve megállapították, hogy az AMP jelenléte csökkentette, az ATP, ill. G-1-P jelenléte csak kismértékben változtatta meg, ugyanakkor a G-6-P jelenléte jelentős mértékben csökkentette az ESR jelölő mobilitását a ligand-mentes enzimnél meghatározott mobilitáshoz képest. A lassan reagáló -SH csoportok reaktivitásának vizsgálatánál megállapították, hogy a nukleotid kötőhelyhez kapcsolódó ligandok (AMP, IMP, ATP, ADP, G-6-P) csökkentik, az aktív centrumhoz kötődő szubsztrát jelenléte pedig növeli ezen -SH csoportok reaktivitását a natív enzimhez képest. Ezekből a kísérletekből származó eredmények igazolják, hogy az enzim ligandjainak kötődése a megfelelő kötőhelyekhez, kisebb-nagyobb mértékben megváltoztatják az enzim konformációját, ill. dinamikai sajátosságát. Saját vizsgálatainkban a ligand kötődés hatására bekövetkező ezen változásokat kívántuk detektálni a lumineszcencia spektroszkópia módszereivel. Erre az adott lehetőséget, hogy a foszforiláz *b* két fajta kromofór csoportot (Trp aminosavak, valamint az enzim koenzimje, a piridoxál-5'-foszfát) tartalmaz.

A fehérjékből származó, a Trp csoportok által emittált foszforeszcencia detektálása lehetővé teszi a fehérjemátrix konformációs fluktuációjának, valamint a Trp csoportok mikrokönyezete flexibilitásának tanulmányozását. A kromofór foszforeszcencia élettartamának és környezete mikroviszkozitásának szoros kapcsolata különösen alkalmassá teszi a foszforeszcencia élettartamot, hogy információt nyerjünk a

kromofor környezetének dinamikai sajátosságairól, valamint az abban bekövetkezett változásokról. Strambini és Gonnelli által leírtak szerint a Trp csoportok környezetében a mikroviszkózitás csökkenése a foszforeszcencia élettartam csökkenését eredményezi (Strambini és Gonnelli, 1985; 1995).

A foszforiláz *b* enzimben található Trp csoportok szobahőmérsékletű foszforeszcencia élettartamát mértük a ligand-mentes enzimen, valamint allosztérikus ligandjainak jelenlétében (1 mM AMP, 32 mM G-1-P, 10 mM ATP, 32 mM G-1-P és 1 mM AMP együttes jelenlétében). A foszforiláz *b* monomerenként 12 db triptofán aminosavat tartalmaz (Titani és mtsai, 1977). Korábbi fluoreszcencia kioltási kísérletekből (Matkó és mtsai, 1980), valamint röntgenkristallográfias eredményekből (Acharya és mtsai, 1991) ismert, hogy 3 Trp molekula a fehérje felszínén, 9 pedig a fehérjemátrix hidrofób régióiban helyezkedik el.

A 8. ábrán a Trp csoportok 20.0 °C-on mért foszforeszcencia intenzitásának lecsengési görbéi láthatók a ligand-mentes enzimben (A görbe), ill. 10 mM ATP (B görbe) jelenlétében.



8. ábra A foszforiláz *b* enzimben található Trp csoportok foszforeszcencia intenzitásának időfüggése 20.0 °C-on ( $\lambda_{ex}=295$  nm,  $\lambda_{em}=440$  nm), 50 mM-os  $\beta$ -glicerofoszfát pufferben pH=6.80 (foszforiláz *b* (A), foszforiláz *b* + 10 mM ATP (B)).

A foszforeszcencia intenzitások időbeli lecsengése három exponenciális tag összegeként írható le. A foszforeszcencia élettartamok átlagait a következő egyenlet alapján határoztuk meg:  $\tau_{av}^{ph} = f_1\tau_1 + f_2\tau_2 + f_3\tau_3$ . A 3. táblázat tartalmazza az egyes foszforeszcencia élettartam komponenseket ( $\tau_i$ ), azok amplitúdóját ( $f_i$ ), valamint az azokból számolt átlagos élettartamokat ( $\tau_{av}^{ph}$ ). A foszforiláz *b* Trp csoportjainak átlagos foszforeszcencia élettartama  $43 \pm 5$  ms volt, ami több mint egy nagyságrenddel nagyobb az oldószer számára hozzáférhető Trp csoportok esetében mért értékénél (1-0.1 ms) (Strambini és Gonnelli, 1995). Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az enzimből az eltemetett, foszforeszcenciát mutató Trp aminosavak egy viszonylag rigid környezetben helyezkednek el. 10 mM ATP jelenléte lecsökkentette az átlagos foszforeszcencia élettartamot ( $17 \pm 3$  ms). A foszforeszcencia élettartam komponensek ATP jelenlétében jelentősen csökkentek, viszont a preexponenciális faktorok ( $f_i$ ) gyakorlatilag változatlanok maradtak, ami arra utal, hogy a foszforeszcenciát mutató valamennyi Trp csoport mikrokönyezete megváltozott. A többi alkalmazott ligand (G-1-P és/vagy AMP) jelenléte nem okozott jelentős változást a Trp csoportok foszforeszcencia élettartamában.

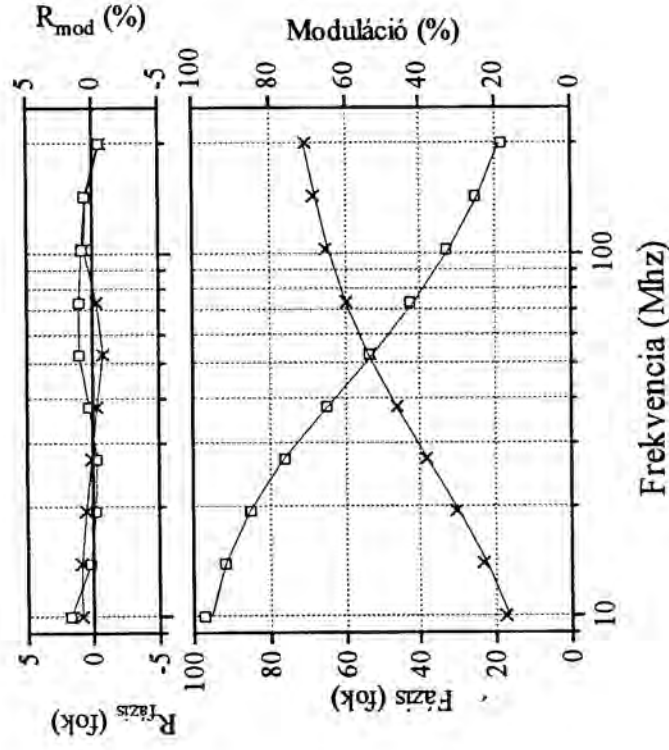


3. táblázat A foszforeszcencia intenzitás időbeli lecsengésének analízisekor kapott foszforeszcencia élettartam és amplitúdó komponensek három exponenciális komponens feltevése. A táblázatban szereplő élettartam és amplitúdó komponensek három vagy több mérés átlagából származnak.

Minta	$\tau_1$ (ms)	$f_1$	$\tau_2$ (ms)	$f_2$	$\tau_3$ (ms)	$\tau_{av}$ (ms)
foszforláz b	15.9±0.2	0.81±0.03	144±8	0.17±0.03	259±15	43±5
foszforláz b + 1 mM AMP	17.6±0.5	0.80±0.02	111±5	0.17±0.03	306±67	42±5
foszforláz b + 32 mM G-1-P	16.1±0.2	0.75±0.07	93±21	0.20±0.02	151±4	38±5
foszforláz b + 10 mM ATP	8.4±1.2	0.77±0.02	34±9	0.20±0.03	112±50	17±3
foszforláz b + 32 mM G-1-P, 1 mM AMP	18.3±1.3	0.78±0.03	112±11	0.19±0.04	224±14	42±6

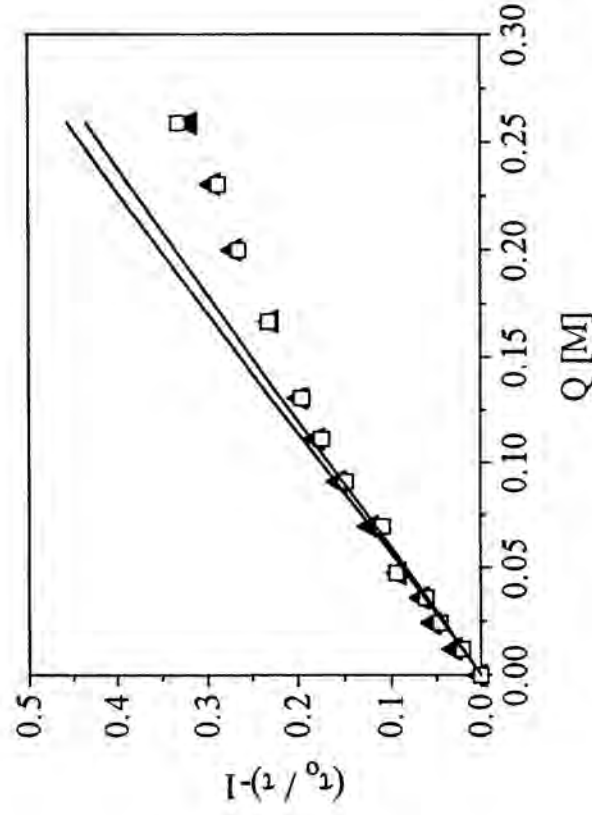
A foszforiláz *b* enzimen végzett korábbi röntgenkristallográfias vizsgálatok szerint az AMP és az ATP ugyanahhoz a nukleotid kötőhelyhez kapcsolódik (Johnson mtsai 1979). Az AMP kötődéséhez szükséges, hogy az  $\alpha$ -2 valamint  $\alpha$ -8 hélix elmozduljon egymás felé. Ez az elmozdulás eredményezheti az enzimaktivitás növekedését. Ugyanakkor kimutatták, hogy az ATP kötődése nem okoz jelentős változást a nukleotid kötőhely szerkezetében. Az ATP az  $\alpha$ -, ill.  $\beta$ -foszfát csoportján keresztül kötődik a foszforiláz *b* két foszfát kötőhelyéhez. Az egyik az AMP, a másik pedig a G-6-P foszfát-kötőhelye (Lorek és mtsai, 1984). Az ATP mintegy átveli ezt a két foszfát-kötőhelyet. A nukleotid kötőhely közelében két Trp csoport található (Trp-67 az  $\alpha$ -2 hélixben, Trp-244 a  $\beta$ -11 lemezben), ezek viszonylag eltemetettek (Lorek és mtsai, 1984), így lehetséges, hogy a fehérje által emittált foszforeszcencia ettől a két Trp csoporttól származik. Ha feltételezzük, hogy szobahőmérsékleten csak ez a két Trp csoport foszforeszkál, akkor az ATP hatására bekövetkezett foszforeszcencia élettartam csökkenést a nukleotid kötőhely körüli flexibilitás növekedése eredményezheti. Mivel nem tudjuk meghatározni a foszforeszcenciát mutató Trp csoportok számát és elhelyezkedését, ezért azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az ATP kötődésének hatására a fehérjemátrix flexibiliusabbá vált, és ez a hatás a nukleotid kötőhely környezetére lokalizálódhat.

Annak eldöntésére, hogy ez a hatás globális vagy csak az érintett Trp csoportok közvetlen környezetére lokalizálódik, a Trp csoportok fluoescenciájának kioltását mértük akrilamid kioltóval a ligand-mentes enzimen, valamint 10 mM ATP jelenlétében. A 9. ábrán az enzimen található Trp csoportok emissziójának fázis és modulációs értékei láthatók. A mérési adatok analízise diszkrét élettartam eloszlást feltételezve történt. Az analízis során az illesztések jóságát a redukált  $\chi^2$  érték meghatározásával becsültük. (A  $\chi^2$  átlag értéke 142.7-ről 4.3-ra csökkent abban az esetben, ha a fluoescencia intenzitás időbeli lecsengését két exponenciális tag összegeként írtuk le egy exponenciális tag helyett. Három exponenciális komponens feltételezése esetén a  $\chi^2$  értéke gyakorlatilag nem csökkent tovább). Ezek szerint a mért adatok analíziséhez két exponenciális komponens feltételezésére van szükség. Az átlagos fluoescencia élettartamokat az (16)-os egyenlet szerint számoltuk ki.



9. ábra. A foszforiláz *b* enzimben található Trp csoportok fluoreszcenciájának fázis és modulációs értékei (□ - □: moduláció és x - x: fázis értékek)  $t = 20.0^\circ\text{C}$ -on. (Mérési körülményeket lásd az "Anyagok és módszerek" fejezetben). A legjobb illesztéskor kapott fluoreszcencia élettartam, valamint amplitúdó értékek a következők voltak:  $\tau_1 = 5.1\text{ ns}$  és  $\tau_2 = 0.7\text{ ns}$ ,  $f_1 = 0.94$  és  $f_2 = 0.06$ . ( $\chi^2 = 7.5$ ). Az ábra felső részén a mért és számolt adatok közötti eltérések láthatók.

A kioltási kísérletekben mért élettartamok Stern-Volmer ábrája látható a 10. ábrán. A kapott kioltási görbék enyhe negatív elhajlást mutatnak magasabb akrilamid koncentrációknál. A negatív elhajlást eredményezheti az, hogy az akrilamid képes kötődni a fehérjéhez. Matkó és munkatársai enzimaktivitás mérések alapján kimutatták, hogy az akrilamid kötődik a foszforiláz *b* enzimhez, és ez a kötődés egy nem kompetitív gátlást eredményez (Matkó és mtsai, 1980). A másik oka az elhajlásnak lehet az is, hogy a foszforiláz *b* 12 db Trp csoportja nem azonos mikro környezetben van, s így az akrilamid ezeknek nem egyformán hatékony kioltója, ami kioltási állandók széles eloszlását eredményezheti (Eftink, 1991).



10. ábra A foszforiláz *b* enzimben található triptofán csoportok által emittált fluoreszcencia akrilamid kioltásának Stern-Volmer ábrája 50 mM  $\beta$ -glicerofoszfát pufferben (pH=6.8, 20.0 °C-on (ligand-mentes enzim (▲), +10 mM ATP jelenlétében (□)).

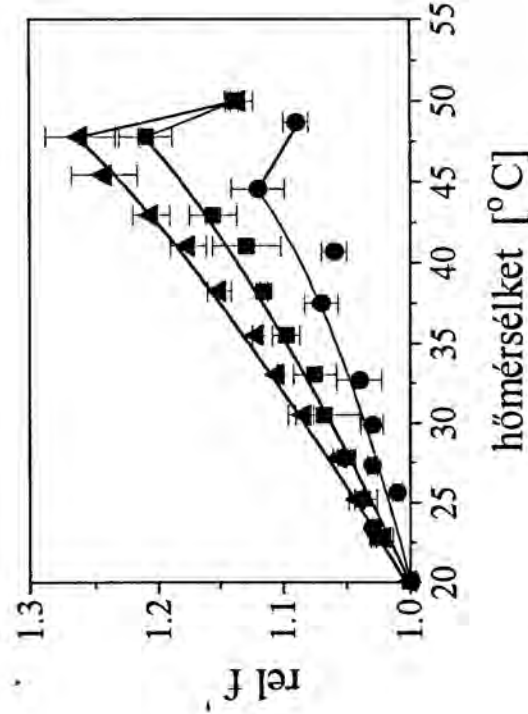
A fentiek miatt a fluoreszcencia kioltási állandók értékeit a Stern-Volmer ábrák kezdeti, lineáris szakaszának meredekségéből határoztuk meg. Az így kapott kioltási állandók értékei a kísérleti hibahatáron belül azonosnak tekinthetők ATP távollétében, ill. 10 mM ATP jelenlétében ( $1.71 \pm 0.10 \text{ M}^{-1}$ ,  $1.69 \pm 0.12 \text{ M}^{-1}$ ). Az fluoreszcencia élettartamok átlagára kioltó távollétében 5.0 ns, ill. 5.1 ns értéket kaptunk a ligand-mentes enzimre, ill. 10 mM ATP jelenlétében. Meghatároztuk a kioltásra jellemző bimolekuláris reakciósebességi állandókat is a  $K_{sv}$  és  $\tau_0$  értékekből a (4)-es összefüggés szerint, amire  $3.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ill.  $3.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  értékeket kaptunk ATP távollétében, ill. jelenlétében. Ezek az értékek egy nagyságrenddel kisebbek, mint az oldószer számára hozzáférhető modellvegyületre meghatározott reakciósebességi állandók értékei ( $3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Eftink és Ghiron, 1976).

A foszforeszcencia élettartam mérések és a fluoreszcencia kioltási kísérletek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az ATP kötődése az enzimhez olyan konformációváltozást eredményez a foszforiláz *b* enzimben, ami szobahőmérsékletű foszforeszcencia emisszióra képes Trp csoport(ok) környezetére lokalizálódik.

Az "Aryagok és módszerek" című fejezetben ismertett Förster - típusú rezonancia energia transzfer mérésén alapuló módszert (Somogyi és mtsai, 1984; 1998)

alkalmaztuk a foszforiláz *b* enzim ligandjai kötődésének hatására bekövetkező dinamikai változások további követésére. A dimer foszforiláz *b* egy több donor - több akceptoros rendszernek tekinthető, mivel alegységenként 12 triptofánt (donort) és egy, a triptofánnal donor - akceptor párt képező piridoxál-5'-foszfát (PLP) csoporttal rendelkezik.

A rezonancia energia transzfer paraméter,  $f'$ , hőmérsékletfüggését tanulmányoztuk a foszforiláz *b* enzimen, ill. alloszterikus ligandjainak jelenlétében (1 mM AMP, 32 mM G-1-P, 10 mM ATP). Az  $f'$  értékében bekövetkező változások a donor és akceptor molekula közötti fehéjmemátrix dinamikai paramétereiről szolgáltatnak információt. A 11. ábrán a normált (relatív)  $f'$  értékeket ábrázoltuk hőmérsékletfüggésben. A normalást a 20.0 °C-on mért  $f'$  értékével végeztük.



11. ábra A 20.0 °C-on mért értékkel normált  $f'$  hőmérsékletfüggése a foszforiláz *b*-re (■), valamint 10 mM ATP (▲), ill. 1 mM AMP (●) jelenlétében. A donort 295 nm-en, az akceptort 335 nm-en gerjesztettük. A donor, ill. az akceptor emisszióját 340 ill. 525 nm-en mértük (a gerjesztési, és az emissziós rés 4 nm).

Az  $f'$  hőmérsékletfüggését leíró görbék a 20-47 °C hőmérséklettartományban az elméleti megfontolásoknak megfelelően emelkedő görbét adtak. Az  $f'$  értékének 47 °C körüli letörése a hődenaturációnak tulajdonítható. A normált  $f'$  érték hőmérséklet profílját összehasonlítva a ligand-mentes enzimre kapott görbével - 32 mM G-1-P jelenlétében nem mutatott változást (az adatokat nem tüntettük fel), ugyanakkor az inhibitor (ATP) hatására az  $f'$  relatív változása nagyobb, az aktivátor (AMP) jelenlétében pedig kisebb.

Az  $f'$  érték változásának értelmezéséhez néhány feltételt (lásd 3.5. fejezetet) teljesedését is meg kellett vizsgálni, ugyanis az átfedési integrál ( $J$ ), az orientációs faktor ( $\kappa^2$ ) vagy az  $\alpha_i$  értékének megváltozása önmagában is eredményezhet változást az  $f'$  értékében. Így megvizsgáltuk az  $\alpha_i$  faktorok állandóságát a 20.0-35.0 °C-os hőmérséklet-tartományban. Az  $\alpha_i$  faktorok meghatározásához mindegyik rendszer esetén meghatároztuk a Trp csoportok (donor) fluoreszcencia élettartamát hőmérséklet függésben. A mért adatok kiértékelésekor az analízis két exponenciális (diszkrét) komponens feltételezésével eredményezte a legjobb illesztést valamennyi ligand jelenlétében. A meghatározott élettartam komponenseket és azok amplitúdóját foglalja össze a 4. táblázat, ami tartalmazza az  $\alpha_i$  értékeket ((26)-os egyenlet) is. Ezek a mérések azt mutatják, hogy a két exponenciális függvény alkalmazásával elvégzett analízis eredményeként kapott komponensek és amplitúdók, valamint az ezen paraméterekből számolt átlagos fluoreszcencia élettartamok a hőmérséklet emelésével csökkenést mutatnak. Az  $\alpha_i$  értékek viszont hibahatáron belül (megközelítőleg 5 % az  $\alpha_1$ , ill. 25 % az  $\alpha_2$  esetében) megegyeznek az adott hőmérséklettartományban.

Annak eldöntésére, hogy az  $f'$  változását okozhatja-e a donor-akceptor molekulák relatív orientációjának megváltozása, mindegyik rendszerben meghatároztuk a donor, ill. az akceptor, valamint a donoron keresztül gerjesztett akceptor emissziós anizotropiájának hőmérsékletfüggését. Ezek az anizotropia értékek függenek ugyan az aktuális hőmérséklet értékétől, viszont függetlenek a foszforiláz  $b$  enzim egyes ligandjainak jelenlététől, vagyis az  $f'$  vizsgálatokor talált ligand-hatás nem tulajdonítható az orientációs faktor változásának.

Az átfedési integrál értékének különbözősége általános esetben ugyancsak eredményezheti az  $f'$  megváltozását, ezért mértük a donor emissziós spektrumát, valamint az akceptor abszorpciós spektrumát hőmérséklet, ill. ligand-függésben. A donor emissziós, valamint az akceptor abszorpciós spektrumának pozíciója, finomszerkezete nem mutatott hőmérséklet, ill. ligand függést. Ily módon kimutattuk, hogy az  $f'$  hőmérséklet-függése az intramolekuláris lokális fluktuációk amplitúdójának változása okozza.

Foszforiláz b						
t (°C)	$\tau_1$ (ns)	$f_1$	$\tau_2$ (ns)	$\tau_{\text{átlag}}$ (ns)	$\alpha_1 = \tau_1 / \tau_{\text{átlag}}$	$\alpha_2 = \tau_2 / \tau_{\text{átlag}}$
20	5.19	0.90	1.00	5.10	1.02	0.20
25	4.94	0.86	1.19	4.83	1.02	0.24
30	4.90	0.89	0.97	4.81	1.02	0.20
35	4.78	0.90	0.95	4.69	1.02	0.20
+ 10 mM ATP						
20	4.96	0.89	0.83	4.88	1.02	0.17
25	4.98	0.87	1.05	4.85	1.02	0.22
30	4.81	0.89	0.82	4.73	1.02	0.17
35	4.76	0.88	0.87	4.67	1.02	0.19
+ 32 mM G-1-P						
20	4.92	0.92	0.83	4.86	1.01	0.17
25	4.91	0.89	1.04	4.81	1.02	0.22
30	4.93	0.86	1.35	4.78	1.03	0.28
35	4.73	0.89	0.96	4.64	1.02	0.21
+ 1 mM AMP						
20	5.45	0.82	1.39	5.23	1.04	0.27
25	5.28	0.82	1.28	5.08	1.04	0.25
30	5.25	0.79	1.39	4.99	1.05	0.28
35	5.07	0.88	1.34	4.84	1.05	0.28

4. táblázat A triptofán csoportok fluoreszcencia élettartam komponenseinek ( $\tau_i$ ), azok amplitúdójának ( $f_i$ ), valamint az ezekből számolt átlagos fluoreszcencia élettartamoknak ( $\tau_{\text{átlag}}$ ), ill. az  $\alpha_i$  értékeknek a hőmérsékletfüggése.

A foszforiláz *b* enzimben található triptofán csoportok és a koenzim (PLP) közötti Förster típusú energiáttranszfer hőmérsékletfüggésének tanulmányozása alapján megállapíthatjuk, hogy az enzim szerkezete az inhibitor (ATP) jelenlétében - a foszforeszcencia élettartam mérésekkel összhangban - flexibilisebbé vált. Ugyanakkor az enzim aktivátorának (AMP) kötődése rigidebb stuktúrát eredményezett. Az enzim szubsztrátjának (G-1-P) kötődése az enzim dinamikai sajátosságait nem befolyásolta detektálható mértékben.

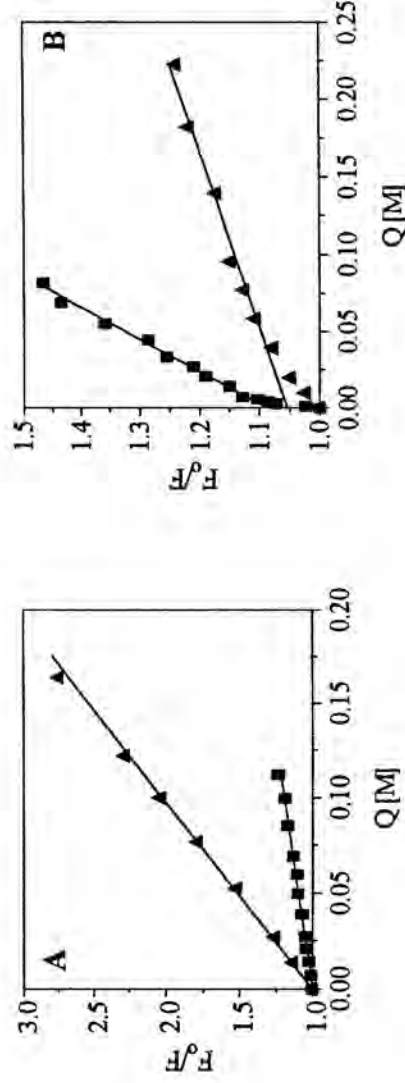
### 4.3. A foszforiláz *b* enzim aktív centrumának lokális dinamikája

Mint azt az irodalmi áttekintés során megállapítottuk, a glikogén foszforiláz által katalizált reakció egyes lépései - különösen a koenzim (PLP) szerepe a katalitikus folyamatban - nem teljesen tisztázottak. A korábbi vizsgálatokból kitűnik, hogy a szubsztrátok, valamint a koenzim kölcsönhatása a katalitikus folyamatban meghatározó lehet. Ennek megfelelően célul tűztük ki, hogy az aktív centrum lokális dinamikáját, valamint az aktív zseben belül a kisméretű molekulák mozgását tanulmányozzuk, jellemezzük. Kísérleteinkkel arra kerestünk választ, hogy a kisméretű molekuláknak az aktív zsebben történő mozgása a vizes fázisban történő mozgásához hasonló paraméterekkel jellemezhető, vagy azok mozgását inkább a fehérjemátrix intramolekuláris dinamikája kontrollálja. Mivel az aktív zsebben található koenzim fluoreszcencia sajátosságokkal rendelkezik, így az a fluoreszcencia spektroszkópia módszerével tanulmányozható. Honikal és Madsen (1973) a különböző ligandok által okozott konformációváltozások követésére alkalmazták a PLP fluoreszcenciájának jodid ionokkal történő kioltását. Matkó és munkatársai által végzett korábbi vizsgálatok szerint a G-1-P kötőhelyre különböző anionok ( $I^-$ ,  $IO_3^-$ ) képesek bekötődni, s ezen kötődés eredményeképpen kompetitív gátlást, s ugyanakkor a PLP fluoreszcencia kioltását eredményezni (Matkó és mtsai, 1984). Elképzelésük szerint a PLP fluoreszcencia kioltása első közelítésben úgy képzelhető el, hogy a kioltó és a PLP dinamikus kontaktusba kerül a PLP fluoreszcencia élettartama alatt. A "steady-state" és időfüggő fluoreszcencia kioltási vizsgálatok tehát információt nyújthatnak a PLP és az



anionkötőhely (szubsztráktöbbehely) relatív fluktuációjáról, valamint az anionok (szubsztrátok) hidrofób zseben belüli "diffúziós" mozgásáról.

Ennek megfelelően fluoreszcencia kioltási vizsgálatokat végeztünk a foszforiláz *b* aktív centrumába kötött koenzimen (PLP), valamint annak modellvegyületén, a piridoxamin-5'-foszfáton (PMP) két azonos töltésű, de különböző méretű anionos kioltóval (jodid, jodát). Kísérleteink szerint a koenzim (PLP) fluoreszcenciájának kioltása anionos kioltókkal eltérést mutat a modellvegyülethez képest. A 12. ábrán látható, hogy míg a modellvegyület esetében mind a jodid, mind a jodát ionnal történő fluoreszcencia kioltás Stern-Volmer ábrája lineáris, addig a foszforiláz *b*-nél mindkét kioltó esetében viszonylag alacsony kioltó koncentrációknál, a kezdeti egyeneshez képest jelentős negatív eltérést tapasztaltunk. Ugyanígyen koncentrációjú KCl jelenléte a koenzim fluoreszcenciáját nem befolyásolja, tehát a fenti eltérést nem az ionerősség növekedése okozza. Matkó és munkatársai a Stern-Volmer görbék kezdeti szakaszára illesztett egyenes meredekségéből határozták meg a látszólagos kioltási állandókat, és az így kapott paraméterek felhasználásával vonták le következtetéseiket.

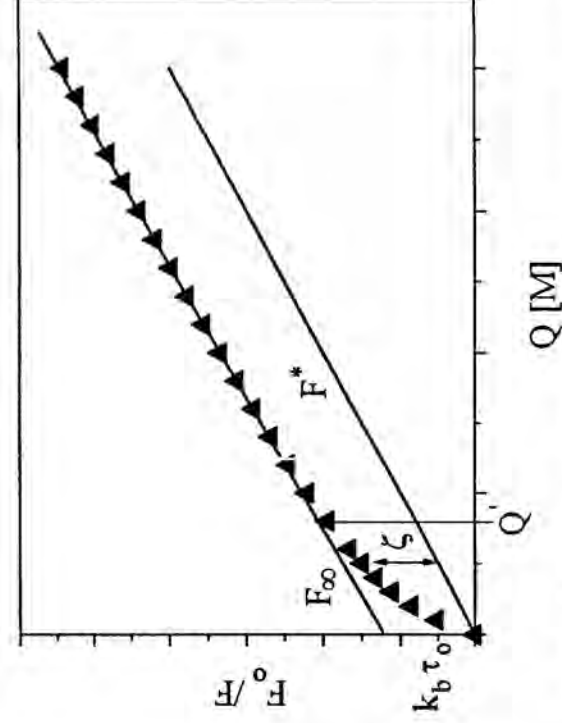


12. ábra Piridoxil fluoreszcencia kioltása  $I^-$  (▲), ill.  $IO_3^-$  (■) ionnal ( $t=25.0$  °C,  $pH=6.8$ ).

A) A modellvegyület (PMP) fluoreszcenciájának kioltása ( $\lambda_{ex}=325$  nm,  $\lambda_{em}=390$  nm)  
B) A foszforiláz *b* enzimen kötött PLP fluoreszcenciájának kioltása ( $\lambda_{ex}=335$  nm,  $\lambda_{em}=525$  nm).

A fenti tények alapján szükségesnek tartottuk a kioltás mechanizmusának feltülvizsgálatát. A kapott nem-lineáris kioltási görbe analizisére kidolgoztunk egy modellt, aminek segítségével lehetőség nyílt arra, hogy a koenzim fluoreszcencia kioltásánál fellépő párhuzamos kioltási folyamatokat a valósághoz közelebb álló módon jellemezzük (Somogyi és mtsai, 1995). Feltételezésünk szerint a koenzim fluoreszcenciájának kioltásánál két párhuzamos folyamat zajlik: egyrészt az ionos karakterű kioltók ( $I$ ,  $IO_3^-$ ) bekötődnek a zseben belül a G-1-P kötőhelyre (ami egyben magyarázza kompetitív inhibitor jellegüket is (Matkó és mtsai, 1984)), másrészt az aktív zsebben “szabadon mozgó” anionok is hozzájárulnak a kioltáshoz. A modell lehetővé teszi a zseben belüli “szabad” anion, ill. a kötött anion fluoreszcencia kioltási állandóinak, valamint a kötött anion disszociációs állandójának meghatározását.

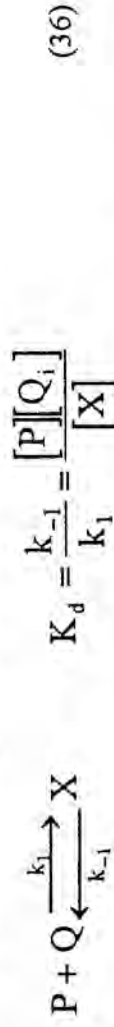
A foszforiláz  $b$  enzimben kötött koenzim által emittált fluoreszcencia anionokkal történő kioltásának Stern-Volmer ábrája látható sematikusán a 13. ábrán. A kötőhely alacsony  $I$ , és  $IO_3^-$  koncentrációknál telítődik, és magasabb ionkoncentrációknál a Stern-Volmer ábrák egyenessé válnak (lásd a 12. B. ábrát).



13. ábra A foszforiláz  $b$  koenzimje által emittált fluoreszcencia anionokkal történő kioltásának sematikus Stern-Volmer ábrája.

A fenti feltételezések szerint a foszforiláz  $b$  enzimnek kioltó jelenlétében két formája létezik: a kioltóval komplexet nem képező, ill. a kioltóval komplexben lévő enzim. Az enzimben található teljes kötőhely koncentráció legyen  $[P]$ , a “szabad” kioltó koncentráció a hidrofób zsebben  $[Q_i]$ , az enzim-kioltó komplex koncentrációja  $[X]$ .

Az enzim - kioltó komplex képződésének egyensúlya:



Feltételezve, hogy a teljes kioltó koncentráció ( $[Q_T]$ ) sokkal magasabb, mint a teljes enzim koncentráció ( $[P_T]$ ), az  $[X]$  és  $[P]$  koncentrációját a következőképpen adhatjuk meg:

$$[X] = \frac{[P_T][Q_i]}{K_d + [Q_i]} = \frac{[P_T][Q_T]}{K_d + [Q_T]} \quad (37)$$

$$[P] = \frac{[P_T]K_d}{K_d + [Q_i]} = \frac{[P_T]K_d}{K_d + [Q_T]} \quad (38)$$

A foszforiláz  $b$  enzimen kötött PLP fluoreszcencia kvantumhatásfoka kioltó távollétében a következő egyenlettel írható fel:

$$\Phi_o = \frac{k_f}{k_f + k_o} = k_f \tau_o \quad (39)$$

ahol  $k_f$  a fluoreszcencia átmenet reakciósebességi állandója,  $k_o$  pedig a sugárzásmentes átmenetek összegzett reakciósebességi állandója,  $\tau_o$  a PLP fluoreszcencia élettartama kioltó nélkül.

Kioltó jelenlétében a PLP fluoreszcencia kvantumhatásfoka a következő két egyenlettel adható meg attól függően, hogy a kioltó komplexet képez ( $\Phi_{PX}$ ), vagy nem ( $\Phi_P$ ) a fehérjével:

$$\Phi_{PX} = \frac{k_f}{k_f + k_o + k_b + k_+ [Q_T]} \quad (40)$$

$$\Phi_P = \frac{k_f}{k_f + k_o + k_+ [Q_T]} \quad (41)$$

ahol  $k_+$  a zsebben "szabadon mozgó" kioltó és a fluorofór (PLP) ütközésére jellemző reakciósebességi állandó,  $k_b$  pedig a zsebben kötött kioltótól származó kioltási folyamat reakciósebességi állandója.

Figyelembe véve, hogy a kvantumhatásfok arányos a fluoreszcencia intenzitással, az  $F_o/F$  hányadosra a  $Q_T < Q'$  tartományban, egy nem-lineáris összefüggést kapunk:

$$\frac{F_o}{F} = \frac{[P_o]\Phi_o}{[P]\Phi_P + [X]\Phi_{PX}} \quad (42)$$

$$\frac{F_o}{F} = \frac{K_d + [Q_T]}{K_d} + \frac{[Q_T]}{1 + k_+ \tau_o [Q_T] + k_+ \tau_o [Q_T]} \quad (43)$$

Magas kioltó koncentráció esetén ( $Q_T \gg K_d = [Q]$ ), amikor az enzim anionkötőhelyei telítettek, az  $F_o/F$  a kioltó koncentrációjának elsőfokú függvénye.

$$\lim_{\frac{K_d}{[Q_T]} \rightarrow 0} \frac{F_o}{F} = F_\infty = 1 + k_b \tau_o + k_+ \tau_o [Q_T] \quad (44)$$

Az egyenes tengelymetszetéből -  $(1 + k_b \tau_o)$  - a fluorofór fluoreszcencia élettartamának ismeretében a kötött kioltó fluoreszcencia kioltásának reakciósebességi állandóját számíthatjuk ki. A (44) egyenlet meredekségéből a  $k_+$  értékét határozhatjuk meg.

Az 13. ábrán az  $F^*$ -gal jelzett egyenes egyenlete:

$$F^* = F_\infty - k_b \tau_o = 1 + k_+ \tau_o [Q_T] \quad (45)$$

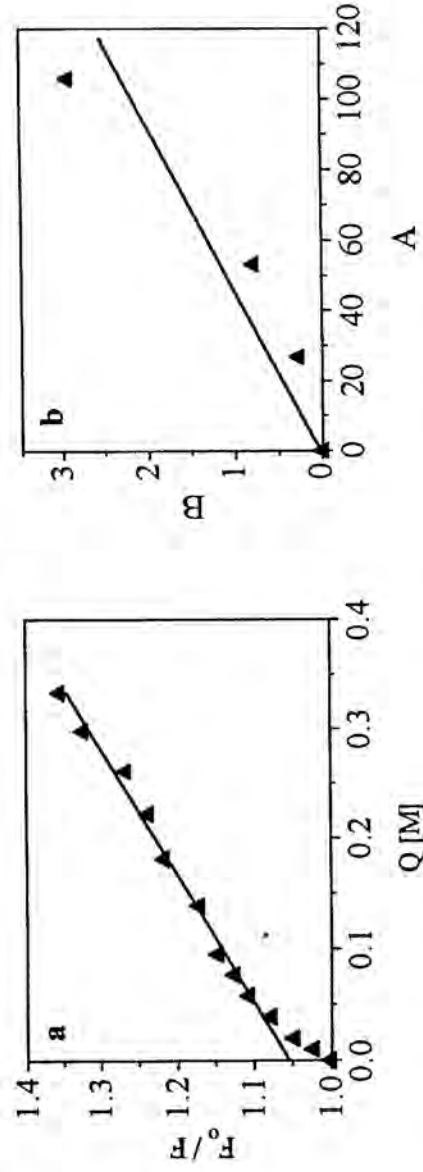
Ha képezzük a mérési pontok és az  $F^*$  különbségét (amit  $\xi$  jelöl), a  $[Q_T] < [Q]$  tartományban felírható:

$$\xi = \frac{K_d + [Q_T]}{K_d} + \frac{[Q_T]}{1 + k_+ \tau_o [Q_T] + k_+ \tau_o [Q_T]} - (1 + k_+ \tau_o [Q_T]) \quad (46)$$

Az egyenlet megfelelő átalakítása után, az  $F_\infty$  és az  $F^*$  alkalmazásával a következő összefüggéshez jutunk:

$$\frac{k_b \tau_0}{\xi} - 1 = K_d \frac{1 + k_b \tau_0 + k_+ \tau_0 [Q_T]}{1 + k_+ \tau_0 [Q_T]} \frac{1}{[Q_T]} = K_d \frac{F_\infty}{F^*} \frac{1}{[Q_T]} \quad (47)$$

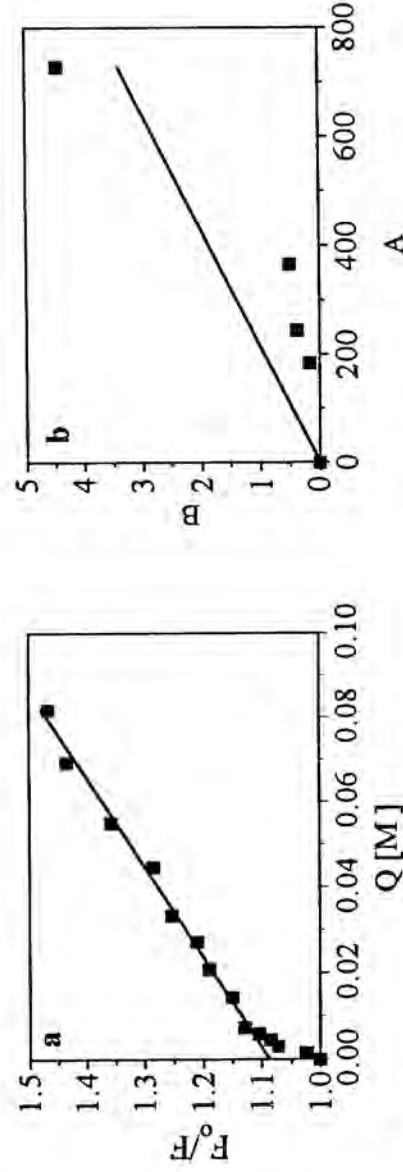
Ha a  $(k_b \tau_0 / \xi) - 1$ -et az  $1/[Q_T](F_\infty/F^*)$  függvényében ábrázoljuk, 0 tengelymetszetű egyenest kapunk, melynek meredekségéből a  $K_d$  értéke meghatározható (14/b, 15/b ábrák).



14. ábra a) PLP fluoreszcencia jodiddal történő kioltásának Stern-Volmer ábrája ( $t=25.0$  °C).

b) Az enzim-kioltó komplex disszociációs állandójának meghatározása a (47) egyenlet alapján.

$$A = \frac{1}{[Q]} \frac{F_\infty}{F^*} ; \quad B = \frac{k_b \tau_0}{\xi} - 1 ; \quad \text{tg} \alpha = K_d$$

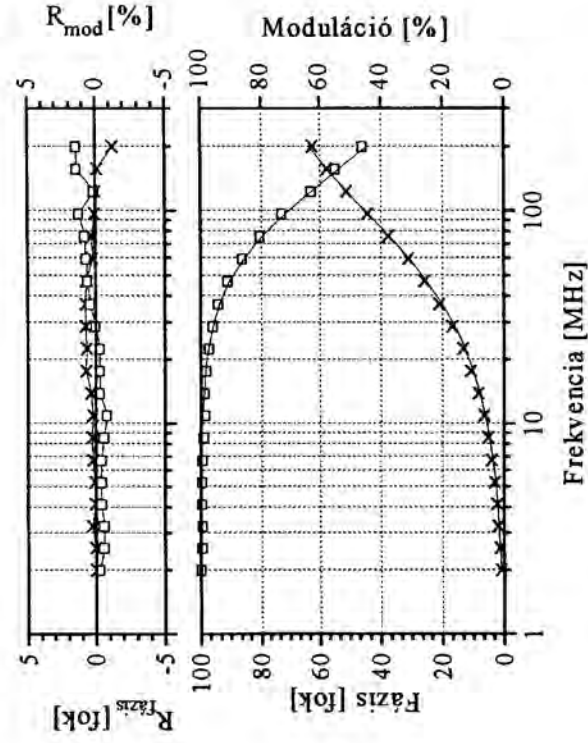


15. ábra a) A PLP fluoreszcencia jodiddal történő kioltásának klasszikus Stern-Volmer ábrája ( $t=25.0$  °C)

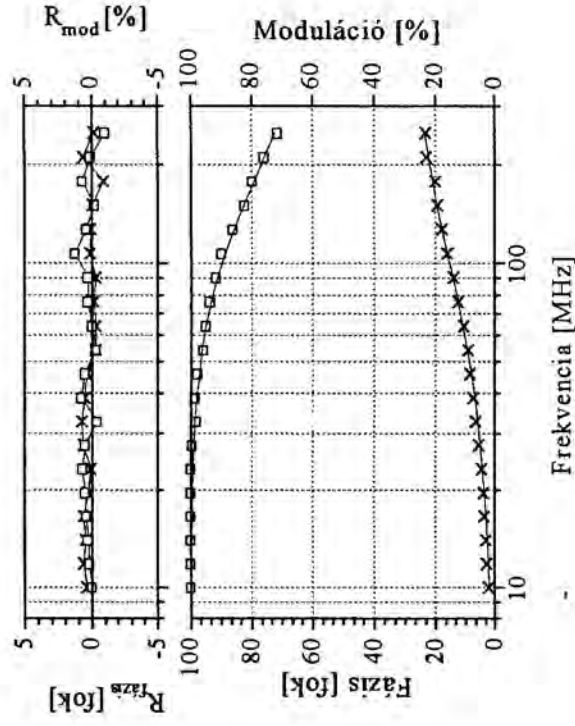
b) Az enzim-kioltó komplex disszociációs állandójának meghatározása.

A kioltók G-1-P kötőhelyére vonatkozó disszociációs állandóinak értékei módszerünk által meghatározhatók váltak. Az így meghatározott disszociációs állandók értékei -  $24.2 \pm 3.5$  mM a jodid, ill.  $4.7 \pm 1.3$  mM a jodát esetében - kb. harmada Matkó és munkatársai által, a fényszórás segítségével meghatározott kompetitív gátlási állandóknak ( $K_T = 57 \pm 2$  mM,  $K_{I0.3} = 16 \pm 3$  mM) (Matkó és mtsai, 1984). Az állandók értékeinél kapott különbségek a két módszer különbségéből eredhet, valamint abból, hogy a gátlási állandók meghatározásánál a minta az aktivátort és a szubsztrátot is tartalmazta.

A kioltási folyamatok reakciósebességi állandóinak ( $k_0$  és  $k_+$ ) meghatározásához ismerni kell az adott fluorofór fluoreszcencia élettartamát. A pontos kinetikai jellemzés érdekében az általunk végzett élettartam mérések adataira támaszkodtunk. A 16. és a 17. ábrákon az élettartam mérések fáziseltolódás, és modulációs értékei láthatók a modulációs frekvencia függvényében a modellvegyületre, valamint a koenzimre vonatkozóan. Az élettartam mérések során kapott adatok kiértékelésekor az analízis a modellvegyület esetében egy, a koenzim esetében pedig két exponenciális (dízskrét) komponens feltételezésével eredményezte a legjobb illesztést. Ezen élettartam mérések szerint a piridoxamin-5'-foszfát modellvegyület fluoreszcencia élettartamára  $1.61 \pm 0.01$  ns értéket kaptunk  $25.0$  °C-on. A koenzim esetében pedig a (16) egyenlet szerint számolt két különböző értékű átlagos élettartamot határoztunk meg ( $0.55 \pm 0.02$  és  $0.49 \pm 0.03$  ns-ot kaptunk a jodid, ill. a jodát kioltók esetében alkalmazott pufferben). Ezeket az élettartamokat három vagy több mérés átlagából számoltuk. A koenzim élettartamánál kapott különbség feltehetően a jodid, és jodát kioltók esetében használt különböző puffer-összetételnek köszönhető. A jodid kioltó esetében a méréseket olyan  $50$  mM-os  $\beta$ -glicerofoszfát pufferben végeztük, ami tartalmazott  $10$  mM  $\beta$ -merkaptotetanolt (MEA), és  $0.1$  mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -ot (lásd az "Anyagok és módszerek" c. fejezetet).



16. ábra A modellvegyület (PMP) fluoreszcenciájának fázis (□ - □) és moduláció (x - x) adatai a modulációs frekvencia függvényébe 25.0 °C-on. (Mérési körülményeket lásd a 3.4. fejezetben;  $\lambda_{\text{ex}}=325$  nm, emissziós oldalon 550FL0725 jelű optikai szűrőt használtunk). Az ábra felső részén a mért és számolt adatok közötti eltérés látható.



17. ábra A koenzim fluoreszcenciájának fázis (□ - □) és moduláció (x - x) adatai a modulációs frekvencia függvényébe 25.0 °C-on. (Mérési körülményeket lásd a 3.4. fejezetben;  $\lambda_{\text{ex}}=335$  nm, emissziós oldalon 535DF35EM jelű optikai szűrőt használtunk). Az ábra felső részén a mért és számolt adatok közötti eltérés látható.

Az 5. táblázatban foglaltuk össze a "steady-state" fluoreszcencia kioltási kísérletekből meghatározható állandók értékeit a modellvegyületre, ill. a foszforiláz *b* kofaktorára vonatkozóan 25.0 °C-on. A modellvegyület esetében kapott bimolekuláris sebességi állandók értékei -  $6.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  jodid, ill.  $1.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  jodát kioltóra - jó egyezést mutatnak a kioltók mobilitása, diffúziós sajátosságai alapján a Smoluchowski egyenlet felhasználásával számolt értékekkel ( $7.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  jodidra, ill.  $2.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  jodátra) (Ando és Asai, 1980; Monk, 1948). A koenzim fluoreszcencia kioltási paramétereit megvizsgálva, és összehasonlítva a modellvegyületre kapott ezen paraméterek értékeivel, meglepő következtetésre jutunk. A koenzim esetében a "szabad" jodát kioltótól származó kioltási folyamat reakciósebességi állandójának értéke ( $k_1 = 9.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) meghaladja a modellvegyületre kapott értéket ( $1.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). A bimolekuláris reakciósebességi állandó értéke csak olyan esetekben lehet magasabb, mint a diffúzió kontrollált érték, ha a kioltó koncentrációja lokálisan megnövekszik, és/vagy ha a dinamikus kioltás mellett a sztatikus kioltás is jelen van.

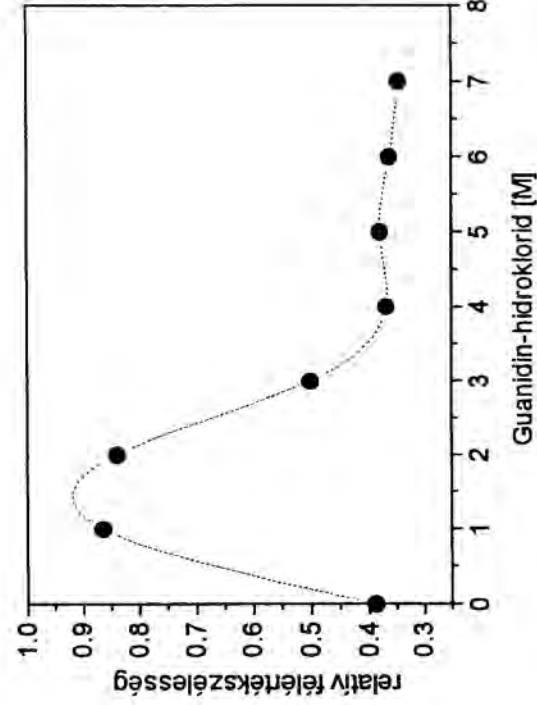
Ezen ellentmondás feloldása érdekében szükségesnek találtuk a PLP fluoreszcenciájának kioltását élettartam mérésekkel megismételni. A mérések kivitelezésénél nehézséget okozott, hogy a PLP rövid fluoreszcencia élettartammal rendelkezik, és ez az egyébként is alacsony élettartam a kioltás következtében még tovább csökken. További nehézséget jelentett az a tény, hogy az élettartam méréseknél egy-egy élettartam érték meghatározása, az adott kioltó koncentráció mellett sokkal hosszabb időt vesz igénybe (lelább 15 perc), mint a "steady-state" fluoreszcencia intenzitás mérése. Ezért élettartam méréseinknél jodid kioltó alkalmazásánál egy adott fehérje mintán általában 2-3 kioltó koncentráció mellett mértük az élettartamot, a következő titrálási lépésekhez újabb fehérje mintát használtunk. A jodát kioltó esetében tovább nehezítette a mérések kivitelezését, hogy a méréseket olyan 50 mM-os  $\beta$ -glicerofoszfát pufferben végeztük, ami nem tartalmazott  $\beta$ -merkaptotetanolt, mivel ez a vegyület redox reakcióba lép a jodát kioltóval. A  $\beta$ -merkaptotetanol az enzim -SH csoportjainak oxidációját fékezi. Ennek a komponensnek a hiánya viszont az enzimetette instabillá. Jodát kioltó esetében minden élettartam mérést új enzimmintán végeztük. Minden mintánál mértük a kioltó távollétében a fluoreszcencia élettartamot ( $\tau_0$ ). Ezekből az élettartamokból számoltunk egy átlagos fluoreszcencia élettartamot (általában három, vagy több mérés átlaga).



5. táblázat A piridoxil "steady-state" fluoreszcencia kioltása ionos kioltókkal.

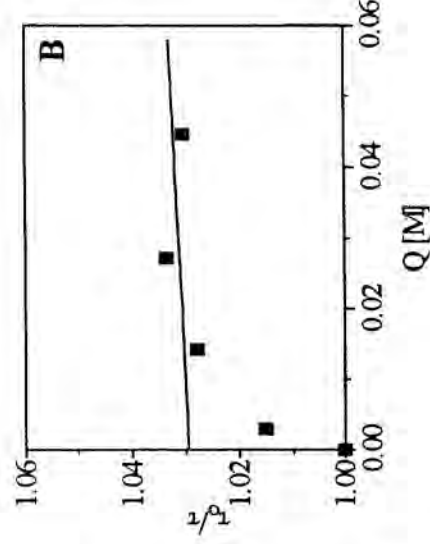
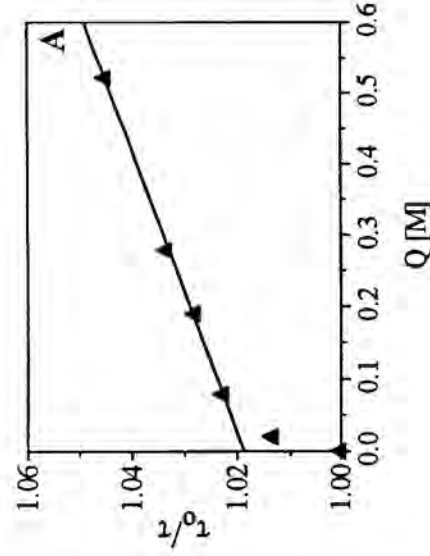
		PMP modellvegyület					PLP a foszforiláz b enzimben				
kioltó	$K_{sv}$ [M <sup>-1</sup> ]	$\tau_0$ [ns]	$k_+ \times 10^9$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$k_{bt_0}$	$k_+ \tau_0$ [M <sup>-1</sup> ]	$\tau_0$ [ns]	$k_b \times 10^8$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_+ \times 10^9$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$K_d$ [mM]	I	$IO_2$
	11.01±0.10	1.61±0.01	6.84±0.08	0.05±0.01	0.88±0.03	0.55±0.02	0.91±0.21	1.61±0.11	24.2±3.5		
	1.98±0.06	1.61±0.01	1.23±0.04	0.08±0.01	4.82±0.14	0.49±0.03	1.63±0.30	9.84±0.88	4.7±1.3		

Az enzim minták stabilitását mérés közben a koenzim fluoreszcencia élettartam-eloszlás relatív félértékisélességének ( $W$ ) meghatározásával ellenőriztük. Feltételezésünk, valamint az irodalmi adatok tanúsága szerint (Bismuto és mtsai, 1988; Ferreira és mtsai, 1994) a Gauss eloszlás félértékisélessége alkalmas paraméter lehet a fehérjemátrix destabilizációjának követésére. Ennek igazolására a Trp fluoreszcencia élettartamát mértük, ami kb. egy nagyságrenddel magasabb, mint a PLP fluoreszcencia élettartama. Ez a tény a mérések kivitelezését könnyebbé tette, viszont az itt levont következtetések általánosíthatók a PLP fluoreszcencia élettartam-eloszlás relatív félértékisélességének értékére is. A 18. ábrán látható a foszforiláz *b* enzimben található Trp fluoreszcencia élettartam-eloszlás relatív félértékisélességének ( $W$ ) változása a guanidin-hidroklorid (denaturáló ágens) koncentrációjának függvényében. Az élettartam adatok analízise egykomponensű Gauss-eloszlás feltételezésével történt. A guanidin-hidroklorid a fehérjék denaturációját okozza azáltal, hogy megszünteti a polipeptid láncok közötti kapcsolatot. A denaturáló szer koncentrációjának függvényében a fluoreszcencia élettartam-eloszlás relatív félértékisélességének változását nyomonkövetve képet kaphatunk a fehérje folytonos denaturációjának ezen paraméter értékére gyakorolt hatásáról. A guanidin-hidroklorid távollétében (natív állapot), valamint a teljes denaturációt létrehozó guanidin-hidroklorid koncentráció közötti koncentráció tartományban a fehérjepopuláció heterogén, a két szélső állapot keveréke van jelen. Ennek megfelelően a fluoreszcencia élettartam eloszlása a homogén natív, és a teljesen denaturált állapotokhoz képest a heterogén fehérjepopuláció esetében (két szélső állapot között) kiszélesedik, ami arra utal, hogy a PLP fluoreszcencia kioltási kísérleteknél jelentkező hasonló tendencia valóban a fehérje destabilizációjának az eredménye. Ennek megfelelően egy adott fehérjemintán legfeljebb addig mértünk, míg a koenzim fluoreszcencia élettartam-eloszlás relatív félértékisélességének értéke nem kezdett el emelkedni.



18. ábra A foszforiláz b enzimben található Trp fluoreszcencia élettartam-eloszlás relatív féltélekezésségének ( $W$ ) változása a guanidin-hidroklorid koncentrációjának függvényében. Mérési körülmények:  $t=25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}=295\text{ nm}$ , a fluoreszcencia emissziót UG21-es sáv-szűrőn keresztül detektáltuk (az élettartam adatok analízise egykomponensű Gauss-eloszlás feltételezésével történt).

A koenzim fluoreszcencia élettartam értékeinek Stern-Volmer ábrái (19. ábra) a “steady-state” mérésekhez hasonlóan telítési görbét adtak mind a jodid, mind a jodát kioltó esetében. Itt is a görbe telítési szakasza illesztett egyenes meredekségéből és tengelymetszetéből határoztuk meg a kioltási paramétereket (6. táblázat). Ezen kísérletek alapján megállapíthatjuk, hogy a PLP fluoreszcenciájának a jodid, vagy jodát ionnal történő kioltásánál a sztatikus mechanizmus dominál, mivel alacsony dinamikus kioltási állandókat kaptunk (6. táblázat). Ez arra utal, hogy feltételezésünk, miszerint a PLP fluoreszcencia kioltása a “szabad”, és a G-1-P kötőhelyhez kapcsolódó kioltótól származik, pontosításra szorul. A “steady-state” és időfüggő fluoreszcencia kioltási kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy a koenzim fluoreszcenciájának kioltása - Matkó és munkatársai által kapott eredményekkel összhangban - egyrészt a G-1-P szubsztrát kötőhelyéhez kapcsolódó kioltóktól származnak (Matkó és mtsai, 1984), másrészt feltételezésünk szerint létezik legalább egy kisebb affinitású kötőhely is a piridoxil-gyűrű közvetlen közelében. Ehhez a helyhez kötődő kioltók sztatikus kioltást eredményeznek.



19. ábra A foszforiláz b enzimben kötött PLP fluoreszcencia élettartam értékeinek Stern-Volmer ábrázolása a jodid (A), ill. a jodát (B) kioltók koncentrációinak függvényében. A fázis és modulációs adatok analizisét két komponensű diszkrét eloszlás feltételezésével végeztük. A gerjesztési hullámhossz 335 nm volt (4 nm-es rés alkalmazásával), a fluoreszcencia emissziót 535DF35EM jelű optikai szűrőn keresztül mértük 25.0 °C-on.

PLP	$k_b \tau_0$	$k_+ \tau_0$ [M <sup>-1</sup> ]	$\tau_0$ [ns]	$k_b \times 10^8$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_+ \times 10^8$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
I <sup>-</sup>	0.02±0.001	0.05±0.001	0.55±0.02	0.36±0.02	0.91±0.05
IO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.03±0.005	0.07±0.17	0.49±0.03	0.61±0.14	1.43±3.54

6. táblázat A PLP időfüggő fluoreszcencia kísérleteinél meghatározott kioltási paraméterek jodid, ill. jodát kioltók alkalmazása mellett,  $t=25.0$  °C-on.

A kisebb affinitású kötőhely(ek) létezését a krisztallográfiás vizsgálatokból származó eredmények is alátámasztják. Ezek szerint a koenzim 5'-foszfát csoportjának közvetlen környezete kb.: 1.5 nagyságú pozitív töltéssel rendelkezik. A kofaktor 5'-foszfát csoportja kapcsolatban van a Lys568-as, a Lys574-es (4.5 Å-re a foszfát csoport oxigén atomjától) és a Glu672-es (4.8 Å) aminosavak bázikus csoportjaival, valamint az  $\alpha$ -21 hélix dipólmomentumával, ami kb. 0.5 értékű parciális pozitív töltéssel rendelkezik (Hol és mtsai, 1978). Az utóbbi évek röntgenkrisztallográfiás vizsgálatai a foszforiláz enzim aktív centrumában, a koenzim közelében több negatív töltésű csoport kötőhelyét mutatták ki. Az egyik a szulfát ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Barford és Johnson 1989), a többi pedig glükóz-

1-foszfát (G-1-P) (Hu, 1991), heptulóz-2-foszfát (H-2-P) (Johnson és mtsai, 1990), piridoxál-5'-difoszfát (PLPP) (Leonidas és mtsai, 1992) molekulák foszfát csoportjainak kötőhelye.

A kisebb affinitású kötőhely(ek)-kioltó komplex disszociációs állandójának tartományát a következő megfontolások alapján becsülhetjük: Tételezzük fel, hogy a kioltóra (Q) nézve  $[P_e]$  koncentrációjú egyéb kötőhely található a mintában, a szabad kioltó koncentráció [Q], a kioltóval betöltött kisebb affinitású kötőhely koncentráció pedig  $[X']$ .

Az emzim-kioltó komplexre az alábbi egyensúly írható fel:



A folyamat disszociációs állandója:

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{([P_e] - [X'])([Q])}{[X']} \quad (49)$$

amelyből a kisebb affinitású kötőhelyre vonatkozóan az emzim-kioltó komplex koncentrációja:

$$[X'] = \frac{[P_e][Q]}{K_d + [Q]} \quad (50)$$

A  $\Phi_0'$  és az  $F_0'$ , ill. a  $\Phi'$  és az  $F'$  jelöli a fluoreszcencia kvantumhatásfokokat és az intenzitásokat abban az esetben, amikor a kioltó nem kötődik, ill. kötődik a kisebb affinitású kötőhely(ek)hez:

$$F_0' = \Phi_0' [P_e] \quad (51)$$

$$F' = \Phi_0' \{ [P_e] - [X'] \} + \Phi' [X'] \quad (52)$$

A kioltó hatására bekövetkező intenzitás csökkenésre ( $\Delta F$ ) a következő összefüggés írható fel:

$$\Delta F = F_0' - F' = (\Phi_0' - \Phi') [X'] \quad (53)$$

Az (50), (51) és az (53) egyenletek felhasználásával, valamint figyelembe véve, hogy a sztatikus kioltás esetében a  $\Phi' = 0$ , az alábbi összefüggés adódik:

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{[Q]}{K_d + [Q]} \quad (54)$$

Az (54)-es egyenlet alapján a kioltók kisebb affinitású kötőhely(ei)re vonatkozó disszociációs állandóinak maximális értékét számolhatjuk ki a fluoreszcencia kioltás sztatikus hozzájárulásából. A disszociációs állandók minimum értékét pedig abból a megfontolásból becsülhetjük, hogy a "steady-state" kioltási kísérleteknél kapott Stern-Volmer ábrák második, lineáris szakaszánál a titrálás során elért maximális kioltó koncentrációknál sem látunk negatív elhajlást az erre a szakaszra illesztett egyeneshez képest (lásd a 14/a és a 15/a ábrákat). Ezek szerint a kisebb affinitású kötőhely(ek)re vonatkozó disszociációs állandók értéke jodidnál 0.33 M, jodátnál pedig 0.08 M fölött van. A fentiek alapján a kisebb affinitású kötőhely(ek) - kioltó komplex disszociációs állandója jodid esetében  $0.33 \text{ M} < K_d \geq 1.24 \text{ M}$ , a jodátra pedig  $0.08 \text{ M} < K_d \geq 0.24 \text{ M}$  tartományon belül található.

Feltételezésünk szerint a másodlagos kötőhely(ek) szerepe egyrészt az lehet, hogy az aktív zseben belül a szubsztrát lokális koncentrációját megnöveli, másrészt a szubsztrát kötődése ehhez a helyhez indukálhat egy olyan konformációváltozást az enzim szerkezetében, ami elősegítheti a szubsztrát nagy-affinitású kötőhelyhez történő kötődését. Ez az indukált konformációváltozás valószínűleg a fehérje nagyobb részeire is kiterjed, mivel Helmreich és Cori megfigyelték, hogy a szubsztrát kötődése elősegíti az aktivátor (AMP) kötődését a nukleotid kötőhelyhez (Helmreich és Cori, 1964). Az aktivátor kötődése további konformációváltozást hoz létre, ami a szubsztrát kötődését fokozza a G-1-P kötőhelyhez.

Az élettartam mérésekből meghatározott, a G-1-P kötőhelyéhez kapcsolódó kioltókra vonatkozó reakciósebességi állandók ( $k_s$ ) alapján megállapíthatjuk, hogy az ehhez a helyhez kötődő kioltók azt a konformációs fluktuációt jelzik, amely során a kioltó és a koenzim kontaktusba kerül. Ezen fluktuációk  $10^7 \text{ s}^{-1}$  frekvenciájú kollektív mozgások, melyeknél szerepe lehet a PLP-t tartalmazó szegmens termikus mozgásának és/vagy a kötőhelyet tartalmazó láncrészek flexibilitásának.

A fluoreszcencia élettartam mérések eredményeinek felhasználásával meghatározott Stern-Volmer kioltási állandó ( $k_s \cdot \tau_0$ ), illetve az abból számolt bimolekuláris sebességi állandó ( $k_+$ ) értékek relatív hibája viszonylag nagy a jodát

esetében  $0.07 \pm 0.17 \text{ M}^{-1}$ , ill.  $1.43 \pm 3.54 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , ld. 6. táblázat). Ez elsősorban annak tulajdonítható, hogy a mérések során az enzim -SH csoportjainak védelmére szolgáló  $\beta$ -merkaptoetanol alkalmazása nem volt lehetséges, így a fehérje kevésbé volt stabil mint pl. a jodid kioltási kísérletek során. Az egyes fluoreszcencia élettartam mérések általában minimálisan 15 percet vettek igénybe. Tekintve, hogy az enzim destabilizációja (denaturációja) az általunk alkalmazott kioltó koncentrációnál magasabb koncentrációk mellett néhány perc alatt végbemegy, a mérési hiba csökkentése az alkalmazott koncentráció-tartomány kiszélesítésével nem volt lehetséges. Ennek megfelelően ezen eredményeink pontosabb kiértékelése érdekében valószínűleg további kísérletek elvégzése szükséges.

## 5. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A fehérjedinamika lumineszcencia spektroszkópia módszereivel történő tanulmányozása során az alábbi eredményekre jutottunk:

A fehérjedinamika jellemzésére új fluoreszcenciás technikát dolgoztunk ki a dinamikus és sztatikus kioltási állandók "steady-state" módszerrel történő szelektív meghatározására. A módszer a "steady-state" fluoreszcencia intenzitás és emissziós anizotrópia szimultán mérésén alapszik. Előnye, hogy nélküle a "steady-state" fluoreszcencia intenzitás mérések mellett szükséges idő-, és költségigényes fluoreszcencia élettartam mérések elvégzése, hogy a dinamikus kioltási állandó értékét meghatározzuk. Módszerünk felhasználásával egyes kísérleti rendszereknél ez a nehézség kikerülhető. A módszer pontosságát számítógépes szimulációval ellenőrizve megállapítottuk, hogy annak hibája összemérhető a klasszikus fluoreszcencia kioltási kísérletek hibájával. A módszer alkalmazhatóságát lizozimhoz kovalensen kötött piridoxamin-5'-foszfát fluoreszcenciájának akrilamiddal történő kioltásával ellenőriztük. A közeg viszkozitásának glicerinnel történő változtatásával a dinamikus kioltási állandó viszkozitás-függésére az irodalomban élettartam mérésekkel igazolt elméleti leírásnak megfelelő (diffúzió-limitált) reciprok összefüggést kaptunk. Összegezve megállapítható, hogy a módszer korlátai - homogén emitter populáció ( $\alpha = 1$ , monoexponenciális lebomlás) - ellenére jól alkalmazható a sztatikus és dinamikus kioltási állandók szeparált meghatározására "steady-state" mérési körülmények között.

A foszforiláz *b* enzim ligandjai által indukált konformációváltozást tanulmányozva kimutattuk, hogy az ATP kötődése jelentősen lecsökkenti a Trp csoportokhoz rendelhető szobahőmérsékletű foszforeszcencia élettartamot. Ez arra utal, hogy az ATP kötődése az emittáló csoportok közvetlen környezetét flexibilisebbé teszi. Annak eldöntésére, hogy ez a változás globális vagy csak a Trp csoportok közvetlen környezetében detektálható, a Trp csoportok fluoreszcenciájának akrilamiddal történő kioltását tanulmányoztuk. Ez utóbbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az enzim globális flexibilitása nem változik az ATP bekötődésével, vagyis a foszforeszcencia mérésekkel detektált változás a foszforeszcenciát mutató (eltemetett) Trp csoport(ok) környezetére lokalizált. Megvizsgáltuk a foszforiláz *b* enzimen található triptofán csoportok (donor molekulák) és a koenzim, PLP (akceptor) közötti Förster típusú rezonancia energia



transzfer hőmérsékletfüggését a ligand-mentes enzimen, valamint ligandjainak jelenlétében. Az energia transzfer hatásfokának a donor kvantumhatásfokával normált értéke ( $f$ ) meredekebben emelkedik a hőmérséklettel, ha a donor - akceptor közötti fehérijemátrix flexibilisebb. Ezen mérések alapján megállapítottuk, hogy az inhibitorral (ATP) telített enzim szerkezete Trp csoportok és a koenzim között - a foszforeszcencia élettartam mérésekkel összhangban - lazább, míg az enzim aktivátorának (AMP) kötődése rigidebb stuktúrát eredményezett.

A foszforiláz  $b$  aktív centrumának lokális konformációs dinamikájának jellemzésére az aktív centrumban kötött koenzim (PLP) fluoereszcenciájának kioltását tanulmányoztuk anionos kioltókkal (jodid, jodát anionnal). A kioltási kísérleteknél kapott nem-lineáris Stern-Volmer görbék analizisére kidolgoztunk egy modellt, aminek segítségével lehetőség nyílt arra, hogy a koenzim fluoereszcencia kioltásánál fellépő párhuzamos kioltási folyamatokat jellemezzük. A módszer lehetővé tette, hogy a különböző kioltási folyamatok kioltási állandóit, valamint a G-1-P kötőhelyhez kapcsolódó anionok disszociációs állandóit meghatározzuk. A "steady-state" és időfüggő kioltási kísérletek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a PLP fluoereszcencia jodid, vagy jodát anionnal történő kioltása egyrészt a G-1-P szubsztrát kötőhelyéhez kapcsolódó kioltóktól származik, másrészt valószínűleg létezik legalább egy kisebb affinitású kötőhely a piridoxil-gyűrű közvetlen közelében. Erre a helyre kötődő kioltók sztatikus kioltást eredményeznek. Meghatároztuk, illetve becsültük a kioltók ezen kötőhelyekre vonatkozó disszociációs állandóit. A szubsztrát kötőhelyhez kapcsolódó kioltók reakciósebességi állandóinak értékei alapján megállapítottuk, hogy a G-1-P kötőhelyét tartalmazó láncrész és a PLP-t kötő szegmens relatív fluktuációja egy  $10^7 \text{ s}^{-1}$  frekvenciájú, termikusan aktivált kollektív mozgásnak tekinthető. Feltételezésünk szerint a másodlagos kötőhely(ek) szerepe egyrészt az lehet, hogy az aktív zseben belül a szubsztrát lokális koncentrációját megnövelji, másrészt a szubsztrát kötődése ehhez a helyhez indukálhat egy olyan konformáció változást, ami elősegítheti a szubsztrát nagy affinitású kötőhelyhez történő kötődését.

## 6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBE TARTOZÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Lakos, Zs., Szarka, Á., Koszorús, L., Somogyi, B.: Quenching-resolved emission anisotropy: A steady-state fluorescence method to study protein dynamics J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1995, 27, 55-60.

Somogyi, B., Szarka, Á., Lakos, Zs.: The local dynamics of the active site region of phosphorylase b Biochem. Biophys. Res. Comm. 1995, 209, 936-943.

Szarka, Á., Gonnelli, M., Gabellieri, E., Cioni, P., Lakos Zs., Somogyi, N.: Alteration of the intramolecular dynamics of glycogen phosphorylase b by allosteric ligands J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1998, 42, 52-56.

Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á., Nyitrai, M.: Protein flexibility as revealed by fluorescence energy transfer. An extension of the method for systems with multiple labels Biochemistry, 1998, (közlésre elküldve)

Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: Anionic quenching of the coenzyme piridoxál-5'-phosphate of phosphorylase b. (előkészületben)

Szarka, Á., Lakos, Zs., Nyitrai, M., Somogyi, B.: The flexibility of glycogen phosphorylase b revealed by fluorescence resonance energy transfer: the influence of nucleotides. (előkészületben)

### 6.1. Az értekezés témakörébe nem tartozó saját közlemények

Lakos, Zs., Szarka, Á., Somogyi, B.: Fluorescence quenching in membrane phase. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1995, 208, 111-117.

Miseta, A., Bogner, P., Szarka, Á., Kellermayer, M., Galambos, Cs., Wheatlay, D.N., Cameron, I.L.: Effect of Non-lytic Concentrations of Brij-series Detergents on the Metabolism-Independent Ion Permeability Properties of Human Erythrocytes. Biophys. J. 1995, 69, 2563-2568.

Bogner, P., Miseta, A., Szarka, Á., Csutora, P., Somogyi, B., Wheatley, D.N.: Correlation between total, ouabain resistant Rb<sup>+</sup> uptake and membrane lipid fluidity of different mammalian erythrocytes. BBA., közlésre elküldve

## 6.2. Posztterek, előadások

Lakos, Zs., Szarka, Á., Nagy, P., Somogyi, B., Damjanovich, S.: Fehérjék fluoreszcencia kioltása emissziós anizotrópia követésével. Magyar Biokémiai Egyesület XXV. Vándorgyűlés, Budapest, 1988. jún.28-júl.2.

Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á.: Quenching-resolved anisotropy: a *steady-state* cost-effective fluorescence technique applicable instead of time-resolved quenching measurements.

in Proceedings of the 1<sup>th</sup> International Conference on Low Cost Experiments in Biophysics (LCEB), December 18-20, 1989, Cairo

Lakos, Zs., Szarka, Á., Damjanovich, S., Somogyi, B.: Quenching-resolved emission anisotropy: a *steady-state* method to resolve static and dynamic quenching components. in Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Biophysics Congress, Vancouver, Canada, júl.29-aug.3., 1990, (p.231.)

Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á., Damjanovich, S.: Fluorescence energy transfer as a tool to study protein dynamics: an extended model.

in Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Biophysics Congress, Vancouver, Canada, júl.29-aug.3., 1990, (p.230.)

Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: A foszforiláz *b* enzim aktív centrumának dinamikus modelljei (előadás)

"Az élő rendszerek biomatematikai modellezése" c konferencia, Siófok, 1991, szept.6-7.

Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: A foszforiláz *b* enzim aktív centrumának lokális dinamikája.

Magyar Biofizikai Társaság XVI. Vándorgyűlés, Budapest, 1991, júl.2-4. (p.97.)

Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á.: The local dynamics of the active site of phosphorylase *b*.

2<sup>nd</sup> Symposium on Instrumental Analysis, Austria, Graz, 1993. May. 25-28. (L9) (előadás)

Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: Quenching-resolved anisotropy: a steady-state method to resolve static and dynamic quenching components.

2<sup>nd</sup> Symposium on Instrumental Analysis, Austria, Graz 1993. May. 25-28. (P2)

Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: Theoretical model for the quenching of the co-factor fluorescence of phosphorylase *b*.

11<sup>th</sup> International Biophysics Congress, Hungary, 1993. July 25-30. (A3.114)

Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á.: Local dynamics of the active center of phosphorylase *b*.

11<sup>th</sup> International Biophysics Congress, Hungary, 1993. July 25-30. (S.B.2.2.)

- Szarka, Á., Lakos, Zs., Somogyi, B.: A foszforiláz b enzim aktív centrumának lokális dinamikája.  
XVII. Országos Lumineszcencia-Spektroszkópia Konferencia, Pécs, 1994 október 4-6.
- Lakos, Zs., Szarka, Á., Gharavi, R., Somogyi, B.: Effect of depolarization on the dynamics of membrane lipids of living cells.  
3rd Symposium on Instrumental Analysis, Hungary, Pécs, 1995. May. 2-5. P20
- Somogyi, G., Lakos, Zs., Szarka, Á., Punyiczki, M., Rosenberg, A., Somogyi, B.: Protein dynamics and fluorescence spectroscopy: quenching of protein fluorescence by acrylamide.  
3rd Symposium on Instrumental Analysis, Hungary, Pécs, 1995. May. 2-5. P21
- Szarka, Á., Gabellieri, E., Lakos, Zs., Strambini, G.B., Somogyi, B.: Intramolecular dynamics of glycogen phosphorylase b as revealed by luminescence spectroscopy.  
3rd Symposium on Instrumental Analysis, Hungary, Pécs, 1995. May. 2-5. P23
- Somogyi, G., Lakos, Zs., Szarka, Á., Punyiczki, M., Rosenberg, A., Somogyi, B.: Fehérje-dinamika és fluoreszcencia kioltás: fehérjék saját fluoreszcenciájának kioltása akrilamiddal.  
Magyar Biofizikai Társaság XVII. Vándorgyűlés, Debrecen, 1995, júl. 2-5. P37
- Szarka, Á., Gabellieri, E., Lakos, Zs., Strambini, G.B., Somogyi, B.: A foszforiláz b enzim intramolekuláris dinamikájának vizsgálata lumineszcencia spektroszkópiai módszerekkel.  
Magyar Biofizikai Társaság XVII. Vándorgyűlés, Debrecen, 1995, júl. 2-5. P41
- Somogyi, G., Lakos, Zs., Szarka, Á., Punyiczki, M., Rosenberg, A., Somogyi, B.: Fehérje-dinamika és fluoreszcencia kioltás: fehérjék saját fluoreszcenciájának kioltása akrilamiddal.  
XVIII. Országos Lumineszcencia-Spektroszkópia Konferencia, Pécs, 1995. október
- Szarka, Á., Gabellieri, E., Lakos, Zs., Strambini, G.B., Somogyi, B.: A foszforiláz b enzim intramolekuláris dinamikájának vizsgálata lumineszcencia spektroszkópiai módszerekkel.  
XVIII. Országos Lumineszcencia-Spektroszkópia Konferencia, Pécs, 1995. Október
- Szarka, Á., Gonnelli, M., Cioni, P., Gabellieri, E., Lakos, Zs., Somogyi, B.: Alteration of the intramolecular dynamics of glycogen phosphorylase b by allosteric ligands.  
Magyar Biofizikai Társaság XVIII. Vándorgyűlés, Pécs, 1997, júl. 6-9. p.115
- Somogyi, B., Szarka, Á., Lakos, Zs., Nyitrai, M.: Macromolecular flexibility as revealed by Förster-type energy transfer  
XIII<sup>th</sup> School "Spectroscopy of Molecules and Crystals", Kiev, Ukrajna, 1997, április 22-28.
- Halasi, Sz., Bódis, E., Szarka, Á., Somogyi, B.: Szerves oldószerek hatása a lipáz enzim konformációs dinamikájára

XXVIII. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 1998, május 26-29.

Somogyi, G., Szarka, A., Visegrády, A., Somogyi, B.: A fehérjemátrixhoz kötődő akrilamid fluoreszcencia kioltásának szelektív meghatározása különböző fehérjerendszerekben

XXVIII. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 1998, május 26-29.

## 7. HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK

- Acharya, K.R., Stuart, D.I., Varvill, K.M., Johnson, L.N. in Glycogen phosphorylase *b*: description of the protein structure, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., (1991) 66-67.
- Alexander Ross, J.B., Laws, W.R., Rousslang, K.W., Wyssbrod, H.R. in: Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 3; Biochemical Applications, (1991) Plenum Press, New York and London (ed.: Lakowicz, J.R.) 33.
- Allison, S.A., McCammon, J.A., Sines, J.J. (1990) *J. Phys. Chem.*, **94**, 7133.
- Ando, T., Asai, H. (1980) *J. Biochem.* **88**, 255.
- Badley, R.A.: Modern Fluorescence Spectroscopy (Ed.: E. L. Wehry) (1976) Vol. 2., chapter 3, p. 112, Plenum Press, New York.
- Baranowski, T., Illingworth, B., Brown, O.H., Cori, C.F. (1957) *Biochim. Biophys. Acta.*, **25** 16.
- Barford, D., Schwabe, J.W.R., Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., Hajdu, J., Papageorgiou, A.C., Martin, L.J., Knott, J.C.A., Vasella, A., Johnson, L.N. (1988) *Biochemistry*, **27**, 6733.
- Barford, D., Johnson, L.N. (1989) *J. Mol. Biol.*, **340**, 609.
- Barford, D., Johnson, L.N. (1989) *Nature*, **340**, 609-614.
- Barford, D., Hu S.-H., Johnson L.N.: (1991) *J. Mol. Biol.*, **218**, 233.
- Bax, A. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 738.
- Binnig, G., Quate, C.F., Gerber. (1986) Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 930.
- Bismuto, E., Gratton, e., Irace, G. (1988) *Biochemistry*, **27**, 2132.
- Boyer, P.D. (1972) *The Enzymes* Vol. VII, Academic Press, New York and London, p. 725.
- Buc-Caron, M.H., és Buc, H.C. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **52**, 575.
- Busby, S.J.W., Radda, G.K. (1976) *Curr. Top. Cell. Reg.*, **10**, 89.
- Bustamante, C., Rivetti, C., Keller, D.J. (1997) *Cur. Opin. Struct. Biology*, **7**, 709.
- Careri, G., Fasella, P., Gratton, E. (1975) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **3**, 141.
- Careri, G., Fasella, P., Gratton, E. (1979) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **8**, 79.
- Careri, G., Gratton, E. (1986) in: Fluctuating Enzyme, ed. G.R. Welsh, New York, John Wiley and Sons, p. 227.
- Cavanagh, J., Fairbrother, W.J., Palmer, A.G., Skelton, N.J. Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice, Academic Press
- Chang, Y.C., Scott, R.D., Graves, D.J. (1987) *Biochemistry* **26**, 360-367.
- Churchich, J.E. (1965) *Biochemistry* **4**, 1405.
- Cori, G.T., Colowick, S.P., Cori, C.F. (1938) *J. Biol. Chem.*, **123**, 381.
- CRC Handbook of Chemistry and Physics, 65th Edition 1984-1985 CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p. D-235.
- Damjanovich, S., Somogyi, B., Welch, G.R. (1983) *J. Theor. Biol.*, **105**, 25.
- Dombbrádi, V., Gergely, P., Bot, G. (1983) *Int. J. Biochem.*, **15**, 1089.
- Eftink, M.R., Ghiron, C.A. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3290.
- Eftink, M.R., Ghiron, C.A. (1976a) *Biochemistry*, **15**, 672.
- Eftink, M.R., Ghiron, C.A. (1976b) *J. Phys. Chem.*, **80**, 486.
- Eftink, M.R. (1983) *Biophys. J.*, **43**, 323.

- Eftink, M.R. (1991) "Topics in Fluorescence Spectroscopy", Volume 2; Principles, Plenum Press, New York and London (ed.: Lakowicz, J.R.) pp.: 76-77.
- Eftink, M.R. (1991) "Topics in Fluorescence Spectroscopy", Volume 2; Principles, Plenum Press, New York and London (ed.: Lakowicz, J.R.) pp.: 114-116.
- Englander, S.W., Downer, N.W., Teitebaum, H. (1972) *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 903.
- Englander, S.W., Manuel, C. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 2387.
- Englander, S.W., Rolfe, A. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 4852.
- Englander, S.W. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **244**, 10.
- Englander, S.W., Kallenbach, N.R. (1984) *Q. Rev. Biophys.*, **16**, 521.
- Englander, S.W., Calhoun, D.B., Englander J.J. (1987) *Anal. Biochem.*, **161**, 300.
- Felman, K., Hull, W.E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 856.
- Ferreira, S.T., Stella, L., Gratton, E. (1994) *Biophys. J.*, **66**, 1185.
- Ferretti, J.A., Weis, G.H. (1989) *Meth. Enzymol.*, **176**, 3.
- Fischer, E.H., Kent, A.B., Snyder, E.R., Krebs, E.G. (1958) *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2906.
- Fischer, E.H., and Krebs, E.G. Muscle phosphorylase b, in *Methods in Enzymology, Academic Press, New York* 5 (1962) 369-373.
- Fletterick, R.J., Madsen, N.B. (1981) *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 31.
- Förster, T. (1948) *Ann. Phys. Leipzig*, **2**, 55.
- Förster, T. (1959) *Disc. Faraday Soc.*, **27**, 7.
- Frauenfelder, H., Petsko, G.A., Tsemoglou, D. (1979) *Nature*, **280**, 558.
- Griffey, R.H., Redfield, A.G., Loomis, R.E., Dahlquist, F.W. (1985) *Biochemistry*, **24**, 817.
- Griffits, J.R., Dwek, R.A., Radda, G.K. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **61**, 237.
- Gurd, F.R.N., Rothgeb, T.M. (1979) *Adv. Protein Chem.*, **33**, 73.
- Haas, E., Wilchek, M., Katchalski-Katzir, E., Steinberg, I.Z. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1807.
- Haas, E., Katchalski-Katzir, E., Steinberg, I.Z. (1978) *Biopolymers*, **17**, 11.
- Hansen, J.E., Rosenthal, S.J., Fleming, G.R. (1992) *J. Phys. Chem.*, **96**, 3034.
- Hedrick, J.L., Shaltiel, S., Fischer, E.H. (1966) *Biochemistry*, **5**, 2117.
- Helmreich, E.J.M., Cori, C.F. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **51**, 131.
- Helmrich, E.J.M., Klein, H.W. (1980) *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, **19**, 441.
- Hers, H.G. (1976) *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 167.
- Hilton, B.D., Woodward, C.K. (1978) *Biochemistry*, **17**, 3325.
- Hoch, J.C., Dobson, C.M., Karplus, M. (1985) *Biochemistry*, **24**, 3831.
- Hol, W.G.J., Van Driijnen, P.T., Berendsen, H.J.C. (1978) *Nature (London)*, **273**, 443.
- Honikel, K.O., Madsen, N.B. (1973) *Can. J. Biochem.*, **51**, 344.
- Hu, S-H., (1991) Crystallographic studies on activated glycogen phosphorylase. Ph.D. Thesis, University of Oxford.
- Hvidt, A., Linderstrom-Lang, K.C.R. (1954) *Trav. Lab. Carlsberg*, **29**, 385.
- Illingworth, B., Cori, G.T. (1953) *Biochem. Prep.*, **3**, 1.
- Jardetzky, O. (1981) *Acc. Chem. Res.*, **14**, 291.
- Jenei, A., Varga, S., Bene, L., Mátyus, L., Bodnár, A., Bacsó, Zs., Pieri, C., Gaspar, R., Farkas, T., Damjanovich, S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7269.
- Jenkins, J.A., Johnson, L.N., Stuart, D.I., Stura, E.A., Wilson, K.S., Zanotti, G. (1981) *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.*, **293**, 23.
- Johnson, L.N., Stura, E.A., Wilson, K.S., Sansom, M.S.P., Weber, I.T. (1979) *J. Mol. Biol.*, **134**, 639.

- Johnson, L.N., Jenkins, J.A., Wilson, K.S., Stura, E.A., Zanotti, G. (1980) *J. Mol. Biol.*, **140**, 565.
- Johnson, L.N., Stura, E.A., Sansom, M.S.P., Babu, Y.S. (1983) *Biochem. Soc. Trans.*, **11**, 142.
- Johnson, L.N., Hajdu, J., Acharya, K.R., Stuart, D.I., MacLaughlin, P.J., Oikonomakos, N.G., Barford, D. (1987) "Allosteric Enzymes" (ed.: Herve, G.) CRC Press, Boca Raton, FL.
- Johnson, L.N., Hajdu, J., Acharya, K.R., Stuart, D.I., McLaughlin, P.J., Oikonomakos, N.G., Barford, D. (1989) Glycogen phosphorylase. In allosteric enzymes (G.Herve, Ed.), pp.81-127. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Johnson, L.N., Acharya, K.R., Jordan, M.D., McLaughlin, P.J. (1990) *J. Mol. Biol.*, **211**, 645.
- Johnson, L.N., Snape, P., Martin, J.L., Acharya, K.R., Barford, D., Oikonomakos, N.G. (1993) *J. Mol. Biol.*, **232**, 253.
- Kaptein, R., Zniderweg, E.R.P., Scheek, R.M., Boelens, R., van Gunsteren, W.F. (1985) *J. Mol. Biol.*, **182**, 179.
- Karplus, M., McCammon, J.A. (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **9**, 293.
- Kasvinsky, P.J., Madsen, N.B., Sygusch, J., Fletterick, R.J. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 3343.
- Kay, L.E., Gardner, K.H. (1997) *Cur. Opin. Struct. Biology*, **7**, 722.
- Klein, H.W., Im, M.J., Helmreich, E.J.M.: Chemical and Biological Aspect of Vitamin B6. Catalysis. Part A. 147. (1984) Liss. New York.
- Klein, H.W., Palm, D., Helmreich, E.J.M. (1982) *Biochemistry*, **21**, 6675.
- Knox, B. D., Rosenberg, A. (1980) *Biopolymers*, **19**, 1049.
- Kossiakoff, A.A. (1982) *Nature*, **296**, 713.
- Kossiakoff, A.A. (1985) *Annual Rev. Biochem.*, **54**, 1195.
- Koshland, D.E., Neet, K.E. (1968) *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 359.
- Krimm, S., Bandekar, J. (1986) *Adv. Protein. Chem.*, **38**, 181.
- Lakos, Zs., Szarka, A., Koszrús, L., Somogyi, B. (1995) *J. Photochem. Photobiol. B.*: **Biol.**, **27**, 55.
- Lakowicz, J.R., Weber, G. (1973) *Biochemistry* **12**, 4161.
- Lakowicz, J.R. (1980) *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **2**, 91.
- Lakowicz, J.R., Weber, G. (1980) *Biophys. J.*, **32**, 591.
- Lakowicz, J.R. (ed) (1983) "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum Press, New York, p. 267.
- Lakowicz, J.R., Maliwal, B., Cherek, H., Balter, A. (1983) *Biochemistry*, **22**, 1741.
- Lakowicz, J.R., Johnson, M.L., Wiczak, W., Bhat, A., Steiner, R.F. (1987) *Chem. Phys. Lett.*, **138**, 587.
- Lakowicz, J.R., Kusba, J., Wiczak, W., Gryczynski, I., Johnson, M.L. (1990) *Chem. Phys. Lett.*, **173**, 319.
- Lakowicz, J.R. (ed) (1991) "Topics in Fluorescence Spectroscopy" vol.: 1-2-3., Plenum Press, New York and London.
- Lakowicz, J.R., Kusba, J., Szmajnski, H., Gryczynski, I., Eis, P.S., Wiczak, W., Johnson, M. (1991) *Biopolymers*, **31**, 1363.
- Lakowicz, J.R., Gryczynski, I. (1992) *Biophys. Chem.*, **45**, 1.
- Lakowicz, J.R., Gryczynski, I., Gryczynski, Z., Davidsen, E., Wirth, M.J. (1992) *J. Phys. Chem.*, **96**, 3000.
- Lehrer, S.S. (1971) *Biochemistry*, **10**, 3254.



- Leonidas, D.D., Oikonomakos, N.G., Papageorgiou, A.C., Acharya, K.R., Barford, D., Johnson, L.N. (1992) *Protein Science*, **1**, 1112.
- Lorek, A., Wilson, K.S., Sansom, M.S.P., Stuart, D.I., Stura, E.A., Jenkins, J.A., Zanotti, G., Hajdu, J., Johnson, L.N. (1984) *Biochem. J.*, **218**, 45.
- Madsen, N.B., Withers, S.G. glycogen phosphorylase: In Coenzymes and Cofactors, Vol. 1. Vitamin B6 pyridoxal phosphate (Dolphin, D., Poulson, R., Avranovic, O., Eds), pp. 355-389. John Wiley, New York.
- Madsen, N.B., Withers, W.G. (1986) Coenzymes and Cofactors: Pyridoxal phosphate and Derivatives (Dolphin, D., Paulson, R., Avramovic, O., Eds) pp 1-29, Wiley, New York.
- Matkó, J., Trón, L., Balázs, M., Hevessy, J., Somogyi, B., Damjanovich, S. (1980) *Biochemistry*, **19**, 5782.
- Matkó, J., Seres, I., Papp, S., Somogyi, B. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 649.
- McCannon, J.A., Karplus, M. (1980) *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **31**, 29.
- McCannon, J.A., Northrup, S.H. (1981) *Nature (London)*, **293**, 316.
- McCannon, J.A., Harvey, S.C. (1987) Dynamics of Proteins and Nucleic Acids, Cambridge Univ. Press
- McLaughlin, P.J., Stuart, D.I., Klein, H.W., Oikonomakos, N.G., Johnson, L.N. (1984) *Biochemistry*, **23**, 5862.
- Monk, H. (1948) *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3281.
- North, A.M. (1964) "The collision Theory of Chemical Reactions in Liquids", John Wiley, London, p. 7.
- Olah, G.A., Trwhella, J. (1994) *Biochemistry*, **33**, 12800.
- Palm, D., Klein, H.W., Schinzel, R., Buehner, M., Helmreich, (1990) *Biochemistry*, **29**, 1099.
- Palmer, A.G. (1997) *Cur. Opin. Struct. Biology*, **7**, 732.
- Parraga, G., Klevit, R.E. (1991) *Meth. Enzymol.*, **208**, 63.
- Parrish, R.F., Uhing, R.J., Graves, D.J. (1977) *Biochemistry*, **16**, 4824.
- Pelley, R., Horowitz, P. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 359.
- Perrin, F. (1936) *J. Phys. Radium*, **VII**, 1.
- Perutz, M.F. (1970) *Nature*, **228**, 726.
- Perutz, M.F. (1979) *Annual Rev. Biochem.*, **48**, 327.
- Petsko, G.A., Ringe, D. (1984) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **13**, 331.
- Ricci, R.W., Nesta, J.N. (1976) *J. Phys. Chem.*, **80**, 974.
- Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J.M., Gaub, H.E. (1997) *Science*, **276**, 1109.
- Ringe, D., Petsko, G.A. (1985) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **45**, 197.
- Rugar, D., Hansma, P.K. (1990) *Atomic force microscopy. Phys. Today.*, **43**, 23-30.
- Saviotti, M.L., Galley, W.C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4154.
- Shaltiel, S., Hedrick, J.L., Pocker, A., Fischer, E.H. (1969) *Biochemistry*, **8**, 5189.
- Shi, L., Kataoka, M., Fink, A.L. (1996) *Biochemistry*, **35**, 3297-3308.
- Singh, S., Tirina, P., Bustamante, C., Keller, D.J., Capaldi, R., (1996) *Febs Lett.*, **397**, 30.
- Somogyi, B., Karasz, F.E., Trón, L., Couchman, P.R. (1978) *J. Theor. Biol.*, **74**, 209.
- Somogyi, B., Papp, S., Rosenberg, A., Seres, I., Matkó, J., Welch, G.R., Nagy, P. (1984) *Biochemistry*, **24**, 6674.
- Somogyi, B., Welch, G.R., Damjanovich, S. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 81.

- Somogyi, B., Matkó, J., Rosenberg, A. (1988) *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, 23 (2) 125.
- Somogyi, B., Lakos, Zs. (1993) *J. Photochem. Photobiol. B.: Biol.*, 18, 3.
- Somogyi, B., Puniyiczki, M., Hedstrom, J., Norman, J.A., Prendergast, F.G., Rosenberg, A. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, 1209, 61.
- Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 209, 936.
- Somogyi, B., Lakos, Zs., Szarka, Á., Nyitrai, M. (1998) Protein flexibility as revealed by fluorescence energy transfer: an extension method for systems with multiple labels  
*Biochemistry* (közlésre elküldve)
- Sprang, S. Yang, D. Fletterick R.J. (1979) *Nature (London)*, 280, 333-335.
- Sprang, S.R., Goldsmith, E.J., Fletterick, R.J., Withers, S.G., Madsen, N.B.: (1989) *Biochemistry*, 21, 5364.
- Sprang, S.R., Withers, S.G., Goldsmith, E.J., Fletterick, R.J., Madsen, N.B. (1991) *Science*, 254, 1367.
- Stalmans, W. (1976) *Curr. Top. in Cell. Regul.*, 11, 51.
- Stern, O., Volmer, M. (1919) *Z. Physik.*, 20, 183.
- Strambini, G.B. (1983) *Biophys. J.*, 43, 127.
- Strambini, G.B., Gonnelli, M. (1985) *Chem. Phys. Lett.*, 115, 196.
- Strambini, G.B., Gabellieri, E. (1987) *Biochemistry*, 26, 6527.
- Strambini, G.B. (1987) *Biophys. J.* 52, 23.
- Strambini, G.B., Gonnelli, M. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 7646.
- Stuhrmann, H.B., Müller, A. (1978) *J. Appl. Crystallog.*, 11, 325.
- Stura, E.A., Zanotti, G., Babu, Y.S., Sansom, M.S.P., Stuart, D.I., Wilson, K.S., Johnson, L.N., Wan der Werve, G. (1983) *J. Mol. Biol.*, 170, 529.
- Surewicz, W.K., Mantsch, H.H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, 952, 115.
- Susi, H. (1972) *Methods Enzymol.*, 26, 455.
- Syguish, J., Madsen, N.B., Kasvinsky, P.J., Fletterick R.J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4757.
- Szabo, A., Shoup, D., Northrup, S.H., McCammon, J.A. (1982) *J. Chem. Phys.*, 77, 4484.
- Takagi, M., Fukui, T., Shimomura, S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3716.
- Takeyasu, Omote, H., Nettikadan, S., Tokumasu, T., Iwamoto-Kihara A., Futai, M. (1996) *Febs Lett.*, 392, 110.
- Taussky, A.H., Shorr, E. (1953) *J. Biol. Chem.*, 202, 675.
- Thomson, N.H., Fritz, M., Radmacher, M., Cleveland, J.P., Schmidt, C.F., Hansma, P.K. (1996) *Biophys. J.*, 70, 2421.
- Titani, K., Koide, A., Hermann, J., Ericsson, L.H., Kumar, S., Wade, R.D., Walsh, K.A., Neurath, H., Fischer, E.H. (1977) *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4762.
- Tobin, M.C. (1972) *Methods Enzymol.*, 26, 473.
- Trewhella, J. (1997) *Cur. Opin. Struct. Biology*, 7, 702.
- Vanderkooi, J.M., Calhoun, D.B., Englander, S.W. (1987) *Science*, 236, 568.
- Vaughan, W.M., Weber, G. (1970) *Biochemistry*, 9, 464.
- Weber, I.T., Johnson, L.N., Wilson, K.S., Yeates, D.G.R., Wild, D.L., Jenkins, J.A. (1978) *Nature (London)*, 274, 433.
- Welch, G.R., Somogyi, B., Damjanovich, S. (1982) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 39, 109-146.
- Welch, G.R., Somogyi, B., Matkó, J., Papp, S. (1983) *J. Theor. Biol.*, 100, 211.
- Withers, S.G., Madsen, N.B., Sprang, S.R., Fletterick, R.J. (1977) *Biochemistry*, 21, 229.

- Withers, S.G., Madsen, N.B., Sykes, B.D., Takagi, M., Shimomuro, S., Fukui, T. (1982) *J. Biol. Chem.*, 256, 5372.
- Wlodawer, A., Sjölin, L. (1982) *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1418.
- Woodward, C.K., Hilton, B.D. (1979) *Annual Rev. Biophys. Bioeng.*, 8, 99.
- Woodward, C.K., Hilton, B.D. (1980) *Biophys. J.*, 32, 561.
- Woodward, C.K., Simon, I., Tüchsen, E. (1982) *Mol. Cell. Biochem.*, 48, 135-160.
- Wright, P.E. (1989) *Trends Biochem. Sci.*, 255.
- Závodszy, P. (1981a) *Haematology*, 14, 79.
- Závodszy, P., Jaton, J.C., Venyaminov, S., Yu, Medgyesi, G.A. (1981b) *Mol. Immunol.*, 18, 39.
- Zhang, H., Zhao, D., Revington, M., Lee, W., Jia, X., Arrowsmith, C.H., Jardetzky, O. (1994) *J. Mol. Biol.*, 229, 735.
- Zhang, Y., Sheng, S., Shao, Z. (1996) *Biophys. J.*, 71, 2168.